



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 492**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04814807 .6**

96 Fecha de presentación : **22.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1697521**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2006**

54 Título: **Sistema multiplásmido para la producción del virus de la gripe.**

30 Prioridad: **23.12.2003 US 532164 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2010

73 Titular/es: **Medimmune, L.L.C.**
Corporation Trust Center, 1209 Orange Street
Wilmington, Delaware 19801, US

72 Inventor/es: **Duke, Greg y**
Kemble, George

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Sistema multiplásmido para la producción del virus de la gripe.

5 Antecedentes de la invención

Los virus de la gripe están compuestos por un núcleo interno de ribonucleoproteína que contiene un genoma de ARN de cadena única segmentada y una envoltura de lipoproteína externa revestida por una proteína de matriz. Cada uno de los virus de la gripe de tipo A y B contiene ocho segmentos de ARN de cadena única con polaridad negativa. El genoma de la gripe de tipo A codifica al menos once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican tres polipéptidos, compuestos por ARN polimerasa dependiente del ARN vírico. El segmento 1 codifica la proteína PB2 del complejo de la polimerasa. Las proteínas PB1 y PA de la polimerasa restantes están codificadas por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Adicionalmente, el segmento 1 de algunas cepas de gripe A codifica una pequeña proteína, PB1-F2, producida a partir de un marco de lectura alternativo dentro de la región de codificación de PB1. El segmento 4 codifica la glicoproteína superficial hemaglutinina (HA) implicada en la unión celular y en la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica el polipéptido de la nucleoproteína de la nucleocápsida (NP), el componente estructural principal asociado con el ARN vírico. El segmento 6 codifica la glicoproteína de envoltura neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica dos proteínas de matriz, designadas M1 y M2, que se traducen a partir de ARNm cortados y empalmados diferencialmente. El segmento 8 codifica NS1 y NS2 (NEP), dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes del ARNm cortadas y empalmadas alternativamente.

Los ocho segmentos del genoma de la gripe B codifican 11 proteínas. Los tres genes más largos codifican los componentes de la ARN polimerasa, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica la proteína HA. El segmento 5 codifica NP, el segmento 6 codifica la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, NB y NA, se traducen a partir de marcos de lectura solapados de un ARNm bicistrónico. El segmento 7 de la gripe B codifica también dos proteínas: M1 y BM2. El segmento más pequeño codifica dos productos; NS1 se traduce a partir de ARN de longitud completa, mientras que NS2 se traduce a partir de una variante de ARNm de corte y empalme.

Se han producido vacunas capaces de producir una respuesta inmune protectora específica de los virus de la gripe durante 50 años. Se pueden clasificar las vacunas como vacunas de virus completo, vacunas de virus dividido, vacunas de antígeno superficial y vacunas de virus atenuado vivo. Aunque las formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacunas son capaces de producir una respuesta inmune sistémica, las vacunas de virus atenuados vivos son también capaces de estimular inmunidad mucosal local en el tracto respiratorio.

FluMist™ es una vacuna atenuada viva que protege a niños y adultos de la enfermedad de la gripe (Belshe y col. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus Vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Nichol y col. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282: 137-44). Las cepas de la vacuna FluMist™ contienen los segmentos génicos HA y NA derivados de las cepas naturales que circulan actualmente junto con seis segmentos génicos, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, procedentes de un virus donante maestro común (MDV). El MDV de las cepas de gripe A de FluMist (MDV-A) se creó mediante un paso en serie de la cepa A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) natural en cultivos primarios de tejido de riñón de pollo a temperaturas sucesivamente más bajas (Maasab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213: 612-4). MDV-A se replica eficazmente a 25°C (ca, adaptado al frío), pero su crecimiento se restringe a 38 y 39°C (ts, sensible a la temperatura). Adicionalmente, este virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (att, atenuación). Se cree que el fenotipo ts contribuye a la atenuación de la vacuna en seres humanos restringiendo su replicación en todas las regiones más frías del tracto respiratorio. Se ha demostrado la estabilidad de esta propiedad en modelos animales y estudios clínicos. A diferencia del fenotipo ts de las cepas de gripe creadas mediante mutagénesis química, la propiedad ts de MDV-A no revierte tras el paso a través de aislados de hámster o niños infectados (para una revisión reciente, véase Murphy y Coelingh (2002) Principal underlying the development an use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines Viral Immunol 15: 295-323).

Estudios clínicos en más de 20.000 adultos y niños que implican 12 cepas separadas 6:2 de genomas reordenados han demostrado que estas vacunas son atenuadas, seguras y eficaces (Belshe y col. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus Vaccine in children N Engl J Med 338: 1405-12; Boyce y col. (2000) Safety and immunogenicity of adjuvanted a unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19: 217-26; Edwards y col. (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J Infect Dis 169: 68-76; Nichol y col. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282; 137-44). Reassortants carrying the six internal genes of MDV-A and the two HA and NA gene segments of de wt virus (6:2 reassortant) consistently maintain ca, ts and att phenotypes (Maassab y col. (1982) Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets J Infect Dis 146: 780-900).

Hasta la fecha, todas las vacunas de la gripe comercialmente disponibles en los Estados Unidos se han propagado en huevos de gallina con embrión. Aunque el virus de la gripe crece bien en los huevos de gallina, la producción de la vacuna es dependiente de la disponibilidad de huevos. Se deben organizar los suministros de huevos, y seleccionarse las cepas para la producción de vacunas con meses de adelanto a la próxima gripe estacional, lo que limita la flexibilidad de esta solución, y a menudo da como resultado retrasos y reducciones en la producción y distribución.

Desafortunadamente, algunas cepas de la vacuna de la gripe, tales como la cepa prototipo A/Fujian/411/02 que circuló durante la estación 2003-04 no se replican bien en huevos con embrión de pollo, y han de aislarse mediante cultivo celular en un procedimiento costoso y que requiere tiempo. La presente invención proporciona además una nueva tecnología que aumenta la capacidad de las cepas de la vacuna de replicarse en huevos con embriones de pollo. Además, la presente invención permite la producción más eficaz y económica de vacunas de la gripe.

Se han desarrollado en los últimos años sistemas para producir virus de la gripe en cultivo celular (*Véanse*, por ejemplo, Furminger. Vaccine Production, en Nicholson y col. (eds) textbook of influenza pp. 324-332; Merten y col. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for Vaccine preparation, en Cohen y Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp. 141-151). Normalmente, estos procedimientos implican la infección de células huéspedes inmortalizadas adecuadas con una cepa seleccionada de virus. Aunque eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patógenas de la gripe crecen bien y se pueden producir de acuerdo a los procedimientos establecidos de cultivo de tejidos. Adicionalmente, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación al frío, adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas, no han crecido satisfactoriamente en cultivos de tejidos usando los procedimientos establecidos.

La producción de virus de la gripe a partir de ADN de genoma reordenado podría aumentar significativamente la flexibilidad y la utilidad de los procedimientos de cultivo de tejidos en la producción de vacunas de la gripe. Recientemente, se ha informado de sistemas para producir virus de la gripe A a partir de plásmidos de genoma reordenados que incorporan ADNc que codifica el genoma vírico (*Véanse*, por ejemplo, Neumann y col. (1999) Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9345-9350; Fodor y col. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J. Virol 73: 9679-9682; Hoffmann y col. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97: 6108-6113; documento WO 01/83794). Estos sistemas ofrecen el potencial para producir virus recombinantes, y virus de genomas reordenados que expresan las proteínas HA y NA inmunógenas procedentes de cualquier cepa seleccionada. Sin embargo, a diferencia del virus de la gripe A, no se han publicado informes describiendo sistemas de solo plásmido para el virus de la gripe B.

Adicionalmente, ninguno de los sistemas de solo plásmido actualmente disponibles es adecuado para generar cepas adaptadas al frío, sensibles a la temperatura, atenuadas adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas. La presente invención proporciona un sistema de ocho plásmidos para la generación del virus de la gripe B completamente a partir de CNA clonado, y los procedimientos para la producción de virus de la gripe A y B atenuados vivos adecuados para formulaciones de vacunas, tales como formulaciones de vacunas de virus vivos útiles para la administración intranasal, así como otros numerosos beneficios que serán aparentes tras la revisión de la memoria.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a los procedimientos para rescatar virus de la gripe de genomas reordenados, incluyendo, por ejemplo, virus de la gripe sensibles a la temperatura (ts) y/o adaptados al frío (ca), atenuados (att), adecuados como vacunas, incluyendo vacunas de la gripe atenuadas vivas, tales como las adecuadas para la administración en una formulación de vacuna intranasal.

En un primer aspecto, la invención proporciona procedimientos para rescatar virus de la gripe B de genomas reordenados en un cultivo celular, por ejemplo, en ausencia de virus auxiliar (es decir, un sistema de cultivo celular libre de virus auxiliar). Los procedimientos de la invención implican introducir una pluralidad de vectores, cada uno de los cuales incorpora una porción de un virus de la gripe B en una población de células Vero capaces de soportar la replicación vírica. Las células Vero se cultivan en condiciones adecuadas para el crecimiento vírico, y se recuperan los virus de la gripe. En algunas formas de realización, los virus de la gripe B son virus atenuados, virus adaptados al frío y/o virus sensibles a la temperatura. Por ejemplo, en una forma de realización, los virus de la gripe B de recombinantes derivados de vector son virus atenuados, adaptados al frío, sensibles a la temperatura, de tal manera que son adecuados para la administración como vacunas atenuadas vivas, por ejemplo en una formulación de vacuna intranasal. En una forma de realización a modo de ejemplo, los virus se producen introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan todo o parte de un genoma del virus de la gripe B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, un genoma del virus B/Ann Arbor/1/66 ca.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, los virus de la gripe B son virus de la gripe contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que incorporan una o más sustituciones de aminoácidos que tienen influencia sobre las propiedades biológicas características de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de la gripe. Dichos virus de la gripe incluyen mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, tales como PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G). Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que individualmente o en combinación, de cómo resultado un aumento en la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío, o la atenuación en relación con los virus naturales es una mutación adecuada en el contexto de la presente invención.

En algunas formas de realización, se introducen en una población de células Vero una pluralidad de vectores que incorporan al menos los 6 segmentos internos de una cepa de gripe B junto con uno o más segmentos del genoma que codifican antígenos superficiales inmunógenos de la gripe de una cepa de gripe diferente. Por ejemplo, al menos

6 segmentos internos del genoma de una cepa de gripe B sensible a la temperatura y/o adaptada al frío, atenuada seleccionada, por ejemplo, una cepa ts, att, ca de B/Ann Arbor/1/66 o una cepa de gripe B construida artificialmente mediante ingeniería genética incluyendo una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones anteriormente especificadas, se introducen en una población de células Vero junto con uno o más segmentos que codifican antígenos inmunógenos derivados de otra cepa de virus. Normalmente, los antígenos superficiales inmunógenos incluyen cualquiera o ambos de los antígenos de hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). En las formas de realización en las que se introduce un segmento único que codifica un antígeno superficial inmunógeno, se introducen también en las células Vero los 7 segmentos complementarios.

En algunas formas de realización, se introducen una pluralidad de vectores plásmidos que incorporan el genoma del virus de la gripe B en una población de células Vero. Por ejemplo, se utilizan 8 plásmidos, cada uno de los cuales incorpora un segmento de genoma diferente, para introducir un genoma completo de la gripe B en las células Vero. Alternativamente, se puede emplear un mayor número de plásmidos, que incorporen subsecuencias genómicas más pequeñas.

Normalmente, los vectores plásmidos de la invención son vectores de expresión bidireccional. Un vector de expresión bidireccional de la invención incluye normalmente un primer promotor y un segundo promotor, en el que el primer y el segundo promotores se unen de manera operable a cadenas alternativas del mismo ADNc de doble cadena que codifica el ácido nucleico vírico incluyendo un segmento del genoma del virus de la gripe. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o secuencia finalizadora. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia finalizadora se pueden localizar flanqueando un segmento del genoma del virus de la gripe interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable en el contexto de la invención es la señal de poliadenilación del SV40. Un vector plásmido a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

Los vectores se introducen en células huéspedes adecuadas capaces de soportar la replicación del virus de la gripe a partir de los promotores del vector. Los ejemplos de células huéspedes incluyen células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS. Son particularmente adecuadas las células Vero, en combinación con los vectores plásmidos pAD3000 descritos en el presente documento.

Las células huéspedes que incluyen los vectores de la gripe B se hacen crecer a continuación en cultivos en condiciones adecuadas para la replicación y el ensamblaje de los virus. Normalmente, las células Vero que incorporan los plásmidos de la gripe B de la invención se cultivan a una temperatura por debajo de 37°C, preferiblemente a una temperatura igual a, o menor de, 35°C. normalmente, las células se cultivan a una temperatura entre 32°C y 35°C. en algunas formas de realización, las células se cultivan a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C. Tras el cultivo durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la replicación del virus a un título elevado, se recuperan los virus de genomas reordenados. Opcionalmente, se pueden inactivar los virus recuperados.

La invención proporciona también procedimientos ampliamente aplicables para producir virus de la gripe de genomas reordenados en cultivo celular introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan un genoma del virus de la gripe en una población de células Vero capaces de soportar la replicación del virus de la gripe, cultivando las células a una temperatura inferior de o igual a 35°C, y recuperando los virus de la gripe.

En algunas formas de realización, se introduce una pluralidad de vectores plásmido en una población de células Vero. En algunas formas de realización, se utilizan 8 plásmidos, cada uno de los cuales incorpora un segmento de genoma distinto para introducir un genoma completo de virus de la gripe en células Vero. Típicamente, los vectores plásmido de la invención son vectores de expresión bidireccional. Un vector plásmido a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

En algunas formas de realización, los virus de la gripe corresponden a un virus de la gripe B. En algunas formas de realización, los virus de la gripe corresponden a un virus de la gripe A. En algunas formas de realización, los procedimientos incluyen recuperar virus de la gripe recombinantes y/o de genomas reordenados capaces de estimular una respuesta inmune tras la administración, por ejemplo, administración intranasal, a un sujeto. En algunas formas de realización, los virus están inactivados antes de la administración, en otras formas de realización, se administran virus atenuados vivos. Son también una característica de la invención los virus de la gripe A y de la gripe B recombinantes y de genomas reordenados producidos de acuerdo a los procedimientos de la invención.

En algunas formas de realización, los virus incluyen un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas propiedades deseables. En una forma de realización, el virus de la gripe incorpora un virus de la gripe de la cepa B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, una cepa atenuada, sensible a la temperatura, adaptada al frío de B/Ann Arbor/1/66. En otra forma de realización, el virus de la gripe incorpora un virus de la gripe de la cepa A/Ann Arbor/6/60, por ejemplo, una cepa atenuada, sensible a la temperatura, adaptada al frío de A/Ann Arbor/6/60. En otra forma de realización de la invención, los virus se construyen artificialmente mediante ingeniería genética incorporando uno o más aminoácidos sustituidos, lo cual influencia las propiedades biológicas características de, por ejemplo A/Ann Arbor/6/60 ca o B/Ann Arbor/1/66 ca. Dichos aminoácidos sustituidos corresponden favorablemente a aminoácidos únicos de A/Ann Arbor/6/60 ca o

H/Ann Arbor/1/66 ca, por ejemplo, en un virus de la cepa A: PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y, en un virus de la cepa B: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M¹⁸³ (M183V). Similarmente, se abarcan otras sustituciones de aminoácidos en cualquiera de estas posiciones dando como resultado sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación, por los virus y procedimientos de la invención.

Opcionalmente, se producen virus de genomas reordenados introduciendo vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa vírica seleccionada por sus propiedades favorables con respecto a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos del genoma que codifican los antígenos superficiales (HA y NA) de una cepa seleccionada, por ejemplo, una cepa patógena. Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente a partir de una cepa H1, H3 o B patogénicamente relevante, como se lleva a cabo rutinariamente para la producción de vacunas. Similarmente, se puede seleccionar el segmento HA a partir de una cepa patógena emergente tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). Alternativamente, se introducen los siete segmentos génicos complementarios de la primera cepa en combinación con cualquier segmento que codifica HA o NA. En algunas formas de realización, los segmentos génicos internos se derivan de la cepa B/Ann Arbor/1/166 o la A/Ann Arbor/6/60 de la gripe.

Adicionalmente, la invención se puede usar para producir virus de la gripe novedosos con propiedades deseables relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, virus de la gripe sensibles a la temperatura, atenuados, y/o adaptados al frío, así como vacunas de la gripe que incluyen dichos novedosos virus de la gripe. Se puede producir un novedoso virus de la cepa A de la gripe introduciendo mutaciones que den como resultado sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones especificadas que demuestran en el presente documento ser importantes para el fenotipo sensible a la temperatura, por ejemplo, PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴. Por ejemplo, se introducen las mutaciones en las posiciones de los nucleótidos PB1¹¹⁹⁵, PB1¹⁷⁶⁶, PB1²⁰⁰⁵, PB2⁸²¹ y NP¹⁴⁶, u otras posiciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición del aminoácido especificado. Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que individualmente o en combinación da como resultado un aumento en la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío o atenuación con respecto a los virus naturales es una mutación adecuada en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, las mutaciones seleccionadas de entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G) se introducen favorablemente en el genoma de una cepa A de la gripe natural, por ejemplo PR8, para producir una variante sensible a la temperatura adecuada para la administración como una vacuna atenuada viva. Para aumentar la estabilidad del fenotipo deseado, se introducen normalmente una pluralidad de mutaciones. Tras la introducción de la mutación(es) seleccionada en el genoma de la gripe, el genoma mutado de la gripe se replica en condiciones en las que se produce el virus. Por ejemplo, se puede replicar el genoma mutado del virus de la gripe en huevos de gallina. Alternativamente, se puede replicar el genoma del virus de la gripe en un cultivo celular. En el último caso, el virus se amplifica adicionalmente de manera opcional en huevos de gallina para aumentar el título. Son también una característica de la invención los virus sensibles a la temperatura, y opcionalmente, atenuados y/o adaptados al frío, producidos de acuerdo con los procedimientos de la invención, como son las vacunas que incluyen dichos virus. Similarmente, son una característica de la invención novedosos ácidos nucleicos víricos de genoma reordenados que incorporan una o más mutaciones en las posiciones PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, por ejemplo, mutaciones seleccionadas de entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G), y los polipéptidos con dichas sustituciones de aminoácidos.

Igualmente, los procedimientos presentados en el presente documento se adaptan para producir novedosas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura, y opcionalmente atenuados y/o adaptados al frío introduciendo una o más mutaciones especificadas en un genoma de gripe B. por ejemplo, se introducen una o más mutaciones que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre PB2⁶³⁰; PA⁴³¹; PA⁴⁹⁷; NP⁵⁵; NP¹¹⁴; NP⁴¹⁰; NP⁵⁰⁹; M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³ en un genoma de la cepa B de la gripe para producir un virus de la gripe B sensible a la temperatura. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen las siguientes: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). Tal como se ha indicado anteriormente, las vacunas que incorporan dichos virus, así como los ácidos nucleicos y los polipéptidos que incorporan estas mutaciones y sustituciones de aminoácidos son todas características de la invención.

En una forma de realización, se introducen una pluralidad de vectores plásmidos que incorporan el genoma del virus de la gripe en las células huéspedes. Se pueden incorporar, por ejemplo, los segmentos del genoma de un virus de la gripe en al menos 8 vectores plásmidos. En una forma de realización preferida, se incorporan los segmentos del genoma de un virus de la gripe en 8 plásmidos. Por ejemplo, se pueden incorporar favorablemente cada uno de los 8 plásmidos a un segmento diferente del genoma del virus de la gripe.

Los vectores de la invención pueden ser vectores de expresión bidireccional. Un vector de expresión bidireccional de la invención incluye normalmente un primer promotor y un segundo promotor, en el que el primer y el segundo promotores se unen de manera operable a cepas alternativas del mismo ácido nucleico vírico de doble cadena que incluye un segmento del genoma del virus de la gripe. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o una secuencia finalizadora. Por ejemplo, se pueden localizar la señal de poliadenilación y/o la secuencia finalizadora flanqueando un segmento del genoma del virus de la gripe interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable en el contexto de la invención es la señal de poliadenilación de SV40, un vector plásmido a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1., las células huéspedes

capaces de soportar la replicación del virus de la gripe a partir de los promotores del vector incluyen células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS. Se prefieren células Vero, en combinación con los vectores plásmidos pAD3000 descritos en el presente documento.

5 Una característica de la invención es el cultivo de células huéspedes que incorporan los plásmidos de la invención a una temperatura por debajo de 37°C, preferiblemente a una temperatura igual a, o menor de, 35°C. normalmente, se cultivan las células a una temperatura entre 32°C y 35°C. en algunas formas de realización, se cultivan las células a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a novedosos procedimientos para rescatar virus de la gripe A o de la gripe B de genomas reordenados (es decir, cepas naturales y variantes de los virus de la gripe A y/o de la gripe) a partir de células Vero en cultivo. Se electropora una pluralidad de vectores que incorporan el genoma de un virus de la gripe en una población de células Vero. Se hacen crecer las células en condiciones adecuadas para la replicación vírica, por ejemplo en el caso de cepas de virus adaptadas al frío, atenuadas, sensibles a la temperatura, se hacen crecer las células
15 Vero a una temperatura por debajo de 37°C, preferiblemente a una temperatura igual a, o menor de, 35°C. normalmente, se cultivan las células a una temperatura entre 32°C y 35°C. en algunas formas de realización, se cultivan las células a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C. Opcionalmente (por ejemplo, para la producción de vacunas), se hacen crecer células Vero en un medio libre de suero sin ningún producto derivado de animal.

20 En los procedimientos de la invención descritos anteriormente, se recuperan los virus tras el cultivo de células huéspedes que incorporan plásmidos del genoma de la gripe. Los virus son virus de la gripe de genomas reordenados que tienen contribuciones genéticas de más de una cepa parental de virus. Opcionalmente, los virus de genomas reordenados recuperados se amplifican adicionalmente mediante el paso en células cultivadas o en huevos de gallina.

25 Opcionalmente, se inactivan los virus recuperados. Los virus recuperados pueden comprender una vacuna de la gripe. Por ejemplo, la vacuna de la gripe recuperada puede ser de virus de la gripe de genomas reordenados (por ejemplo, de los virus de genomas reordenados 6:2 o 7:1) que tienen un antígeno HA y/o NA derivado de una cepa seleccionada de gripe A o gripe B. En algunas formas de realización favorables, los virus de la gripe de genoma reordenados tienen un fenotipo atenuado. Opcionalmente, los virus de genomas reordenados están adaptados al frío y/o son sensibles a la temperatura, por ejemplo, un virus de la gripe B atenuado, adaptado al frío o sensible a la temperatura que tiene una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre las sustituciones de la Tabla 17. Dichos virus de la gripe son útiles, por ejemplo, como vacunas atenuadas vivas para la producción profiláctica de una respuesta inmune específica para una cepa seleccionada, por ejemplo, una cepa patógena de la gripe.

35 Se pueden usar los procedimientos descritos en el presente documento para producir una vacuna del virus de la gripe de genoma reordenado introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan el genoma de un virus de la gripe en una población de células huéspedes capaces de soportar la replicación del virus de la gripe, cultivando las células huéspedes a una temperatura inferior de o igual a 35°C, y recuperando un virus de la gripe capaz de estimular una respuesta inmune tras la administración a un sujeto. Las vacunas pueden ser tanto de virus de la gripe A como de la gripe B. Los virus de la vacuna de la gripe pueden incluir un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, o un virus de la gripe sensible a la temperatura. Alternativamente, los virus pueden poseer una combinación de estas propiedades deseables. El virus de la gripe puede contener un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de la gripe. El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de la gripe. Alternativamente, la vacuna
40 incluye virus de la gripe A o de la gripe B contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que incorporan al menos un aminoácido sustituido que influencia las propiedades biológicas características de A/Ann Arbor/6/60 ca o B/Ann Arbor/1/66 ca, tales como un único aminoácido de estas cepas. Por ejemplo, las vacunas pueden incluir virus de genoma reordenados y virus de la gripe A de genomas reordenados contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵, y NP³⁴, y virus de la gripe B de genomas reordenados contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución en una posición seleccionada de entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³.

55 El virus puede incluir un virus de la gripe de genoma reordenado (por ejemplo, un de genoma reordenado 6:2 ó 7:1) que tiene segmentos del genoma vírico de más de una cepa del virus de la gripe. Por ejemplo, una vacuna del virus de la gripe de genoma reordenado incluye favorablemente un antígeno superficial HA y/o NA derivado de una cepa seleccionada de gripe A o B, en combinación con los segmentos internos del genoma de una cepa de virus seleccionada por sus propiedades deseables con respecto a la producción de vacunas. A menudo, es deseable seleccionar la cepa de la gripe a partir de la cual se derivan los segmentos que codifican HA y/o NA basándose en las predicciones de prevalencia local o mundial de las cepas patógenas (por ejemplo, tal como se describe anteriormente). En algunos
60 casos, la cepa de virus que contribuye a los segmentos internos del genoma es una cepa atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, una de A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, o una cepa de la gripe construida artificialmente mediante ingeniería genética que tiene una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado los fenotipos deseados, por ejemplo, los virus de la gripe A que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ y virus de la gripe B que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹ y M1¹⁸³. Por ejemplo, los virus de genomas reordenados favorables incluyen virus de la gripe A contruidos artificialmente mediante ingeniería genética con una

o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP34 (D34G); y virus de la gripe B que incluyen una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V).

5

Si se desea los virus de la vacuna de la gripe se inactivan tras la recuperación.

Se pueden producir vacunas del virus de la gripe, que incluyen vacunas atenuadas vivas mediante los procedimientos de la invención. En algunas formas de realización favorables de las vacunas del virus de la gripe son vacunas de virus de genomas reordenados.

10

Otro aspecto de la invención proporciona plásmidos que son vectores de expresión bidireccional. Los vectores de expresión bidireccional de la invención incorporan un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un emplazamiento de poliadenilación, por ejemplo, un emplazamiento de poliadenilación de SV40. En una forma de realización, el primer promotor y el segundo promotor pueden estar situados en orientaciones opuestas que flanquean al menos un emplazamiento de clonación. Un vector a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

15

En algunas formas de realización, al menos un segmento del genoma de un virus de la gripe se inserta en el emplazamiento de clonación, por ejemplo, como un ácido nucleico de doble cadena. Por ejemplo, un vector de la invención incluye un plásmido que tiene un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un emplazamiento de poliadenilación de SV40, en el que el primer promotor y el segundo promotor están situados en orientaciones opuestas que flanquean al menos un segmento de un virus de la gripe.

20

Es también una característica de la invención hacer crecer productivamente cultivos celulares que incluyan al menos una célula que incorpora una pluralidad de vectores que incluyan el genoma de un virus de la gripe, a una temperatura inferior de o igual a 35°C. La composición puede incluir también un medio de cultivo celular. En algunas formas de realización, la pluralidad de vectores incluye vectores de expresión bidireccional, que comprenden, por ejemplo, un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un emplazamiento de poliadenilación de SV40. Por ejemplo, el primer promotor y el segundo promotor pueden estar situados en orientaciones opuestas que flanquean al menos un segmento de un virus de la gripe. Los cultivos celulares de la invención se mantienen a una temperatura inferior de o igual a 35°C, tal como entre aproximadamente 32°C y 35°C, normalmente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

25

30

La invención incluye también un sistema de cultivo celular que incluye un cultivo celular que crece productivamente a partir de al menos una célula que incorpora una pluralidad de vectores que comprende el genoma de un virus de la gripe, tal como se describe anteriormente, y un regulador para mantener el cultivo a una temperatura inferior de o igual a 35°C. por ejemplo, el regulador mantiene favorablemente el cultivo celular a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 35°C, normalmente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

35

40

Otra característica de la invención son los virus de la gripe recombinantes o de genomas reordenados contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que incluyen una o más sustituciones de aminoácidos que tienen influencia sobre la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío y/o la atenuación. Por ejemplo, virus de la gripe A contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada de entre: PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, y virus B de la gripe contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³ son formas de realización favorables de la invención. Las formas de realización a modo de ejemplo incluyen virus de la gripe A con una cualquiera de las siguientes sustituciones de aminoácidos: PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y virus de la gripe B con una cualquiera de las siguientes sustituciones de aminoácidos: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). En algunas formas de realización, los virus incluyen una pluralidad de mutaciones, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve sustituciones de aminoácidos en las posiciones identificadas anteriormente. De acuerdo con esto, los virus A de la gripe contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que tienen sustituciones de aminoácidos en las cinco posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, PB³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G) y los virus B de la gripe contruidos artificialmente mediante ingeniería genética que tienen sustituciones de aminoácidos en las ocho o nueve posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V), están abarcados por la invención. Adicionalmente, los virus pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos adicionales no enumeradas anteriormente.

45

50

55

60

En algunas formas de realización, los virus de la gripe contruidos artificialmente mediante ingeniería genética, son virus de la gripe sensibles a la temperatura, virus de la gripe adaptados al frío y/o virus de la gripe atenuados. Por ejemplo, un virus de la gripe sensible a la temperatura de acuerdo con la invención presenta normalmente aproximadamente una reducción de 2,0 y 5,0 log₁₀ en el crecimiento a 39°C en comparación con un virus de la gripe natural. Por ejemplo, un virus sensible a la temperatura presenta favorablemente una reducción de al menos 2,0 log₁₀, al menos aproximadamente 3,0 log₁₀, al menos aproximadamente 4,0 log₁₀, o al menos aproximadamente 4,5 log₁₀.

65

en el crecimiento a 39°C en relación con la de un virus de la gripe natural. Normal, pero no necesariamente, un virus sensible a la temperatura retiene características de crecimiento robusto a 33°C. Un virus de la gripe atenuado de la invención presenta normalmente una reducción de aproximadamente 2,0 y 5,0 log₁₀ en el crecimiento de un ensayo de atenuación en hurones en comparación con un virus de la gripe natural. Por ejemplo, un virus de la gripe atenuado de la invención presenta una reducción de al menos aproximadamente 2,0 log₁₀, frecuentemente aproximadamente 3,0 log₁₀, y favorablemente al menos aproximadamente 4,0 log₁₀ en el crecimiento en un ensayo de atenuación en hurones en relación con el virus de la gripe natural.

La presente invención se refiere también a la identificación y la manipulación de restos de aminoácidos en HA y NA que afectan a la replicación del virus de la gripe en células y en huevos con embrión de pollo. La presente invención se refiere además al uso de tecnología genética inversa para generar variantes HA y NA de vacuna del virus de la gripe con replicación mejorada en células y/o huevos con embrión de pollo. La invención se refiere además a los procedimientos para modular la actividad de la unión del receptor de HA y/o la actividad de la neuraminidasa NA. Adicionalmente, la invención proporciona virus de la gripe con capacidad mejorada para replicarse en células y/o huevos con embrión de pollo.

En una forma de realización, la invención proporciona procedimientos para manipular los restos de aminoácidos de HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus de la gripe de replicarse en células y/o huevos con embrión de pollo. El procedimiento implica la introducción de sustituciones de restos de aminoácidos en HA y/o NA y hace uso de procedimientos para producir virus de la gripe en un cultivo celular introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan el genoma de un virus de la gripe en una población de células huéspedes capaces de soportar la replicación del virus de la gripe, cultivando las células y recuperando el virus de la gripe. Preferiblemente, el virus de la gripe recuperado tiene un aumento en la capacidad de replicarse en células y/o huevos con embrión de pollo. En otra forma de realización, la presente invención proporciona variantes del virus de la gripe con aumento en la capacidad de replicarse en huevos con embriones de pollo (denominadas en el presente documento como “variante(s) de la gripe con replicación potenciada”) cuando se comparan con las cepas víricas de la gripe no modificadas.

Se cultivaron simultáneamente células Vero SF electroporadas (electroporadas con, por ejemplo, polinucleótidos (por ejemplo, plásmidos y vectores) de la invención) con otras células seleccionadas entre el grupo que incluye, pero no se limita a, células de riñón embrionario de pollo (CEK), fibroblastos embrionarios de pollo, células primarias de riñón de pollo, y células aisladas procedentes de la membrana corioalantoica de huevos con embrión de pollo. Otras células útiles para este procedimiento de rescate pueden incluir cualquier célula que soporte la replicación del virus de la gripe y cumpla los estándares aceptables para la aprobación de la normativa. Las fuentes de células incluyen, por ejemplo, bandadas de pollos procedentes de pollos SPF. Véanse los Ejemplos 9 y 10 en el presente documento.

En otra forma de realización preferida de la invención, la eficacia del rescate del virus es al menos del 90%. Se puede determinar la eficacia, por ejemplo, midiendo muchos huevos inyectados con los virus rescatados (X), que tienen títulos de HA posteriormente detectables (Y) y dividiendo Y/X.

Se pueden usar los procedimientos descritos *más arriba* como Ejemplos 9 y 10 para electroporar polinucleótidos (*por ejemplo*, plásmidos y vectores) descritos en el presente documento o, *por ejemplo*, en las solicitudes de patente de los Estados Unidos n^{os} 09/396.539, 09/844.517, PCT/US0113656, PCT/US00/09021; US 03012728, Patente de los Estados Unidos n^o 6.649.372; documentos WO 03/091401, US200201677.

Una forma de realización preferida de la invención es un procedimiento de rescate del virus de la gripe, en el que se electroporan células Vero animales con plásmidos que codifican una ARN polimerasa de la gripe y una nucleoproteína y en el que las células animales electroporadas se cultivan simultáneamente con otro tipo de célula.

Una forma de realización preferida de la invención es un procedimiento de rescate del virus de la gripe (*por ejemplo*, el virus de la gripe A, virus adaptados al frío, unos virus atenuados), en el que las células Vero se electroporan con plásmidos que codifican una ARN polimerasa de la gripe y una nucleoproteína. El número de plásmidos electroporados puede ser, *por ejemplo*, ocho o doce.

Una forma de realización preferida de la invención es un procedimiento de rescate del virus de la gripe (*por ejemplo*, virus de la gripe A, virus adaptados al frío, unos virus atenuados) en el que las células Vero se electroporan con plásmidos que codifican una ARN polimerasa de la gripe y una nucleoproteína y en el que las células animales electroporadas se cultivan simultáneamente con otro tipo de célula (*por ejemplo*, células CEK). El número de plásmidos electroporados puede ser, *por ejemplo*, ocho o doce.

Otra forma de realización preferida de la invención es un procedimiento de rescate del virus de la gripe, en el que (a) se electroporan células Vero con vectores de expresión celular que dirigen la expresión en dichas células de segmentos de ARNv genómicos o antígenómicos, y una nucleoproteína, y una polimerasa dependiente de ARN, tal como los complejos de ribonucleoproteína que se pueden formar y las partículas víricas que se pueden ensamblar sin un virus auxiliar; y (b) cultivar dichas células en las que las partículas víricas se empaquetan y se rescatan.

Otra forma de realización preferida de la invención es un procedimiento de rescate del virus de la gripe, en el que se electroporan células Vero con plásmidos de expresión (véanse, *por ejemplo*, las solicitudes de patente de los Estados Unidos n^{os} 09/396.539, 09/844.517, PCT/US0113656, PCT/US00/09021, US03012728; patente de los Estados

Unidos nº 6.649.372; documentos WO 03/091401, US200201677), comprendiendo, por ejemplo, el ADNc vírico que corresponde al segmento genómico de un virus de la gripe, en el que el ADNc se inserta entre el promotor de la ARN polimerasa I (pol I) y un elemento regulador de la síntesis de ARNv o ARNc con un extremo 3' exacto, que a su vez se inserta entre un promotor de la ARN polimerasa II (pol II) y una señal de poliadenilación, y en el que el ADNc codifica únicamente una proteína del virus de la gripe.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ilustración del plásmido pAD3000 (SEC DE ID Nº: 90).

Figura 2: Micrografías de células infectadas.

Figura 3: Análisis de genotipación del virus rMDV-A y del virus de genoma reordenado H1N1 6:2 procedentes de la transfección del plásmido.

Figura 4: Ilustración del sistema de ocho plásmidos para la producción del virus de la gripe B.

Figura 5: A y B. Caracterización del virus de genoma reordenado MDV-B mediante la PCR-RT; C y D. Caracterización de B/Yamanashi/166/98 de genoma reordenado mediante la PCR-RT.

Figura 6: Secuencia de pAD3000 en el formato del GenBank.

Figura 7: Alineación de la secuencia con MDV-B y ocho plásmidos (SEC DE ID Nºs: 91-98, respectivamente).

Figura 8: Productos de la PCR-RT derivados de la amplificación simultánea de los segmento de HA y NA de cepas de gripe B.

Figura 9: Gráfico de barras que ilustra los títulos relativos de virus recombinantes y de genoma reordenado.

Figura 10: gráfico de barras que ilustra los títulos relativos de un virus de genoma reordenado con temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura).

Figura 11: Representación gráfica de virus de genomas reordenados que incorporan mutaciones específicas (de activación) correlacionadas con la sensibilidad a la temperatura (panel izquierdo) y títulos relativos a temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura) (panel derecho).

Figura 12: Determinación de mutaciones ts en un ensayo de minigenoma. A. Se transfectaron células HEp-2 con PB1, PB2, NP y pFlu-CAT, se incubaron a 33 ó 39°C durante 18 h y se analizaron los extractos celulares para la expresión del gen indicador CAT. B. Expresión del ARNm de CAT mediante el ensayo de extensión del cebador.

Figura 13: Ilustración esquemática de recombinantes triple génicos con restos naturales en proteínas PA, NP, y M1.

Figura 14: Tabulación del crecimiento de virus recombinantes de gen único y doble génico.

Figura 15: Tabulación del resto de aminoácidos de la nucleoproteína correspondiente al fenotipo sin ts.

Figura 16: Diagrama esquemático de mutantes PR8 recombinantes. Se indican las mutaciones introducidas en los genes PB1 y/o PB2 mediante puntos rellenos.

Figura 17: Gráfico de barras que ilustra los títulos relativos a 33°C y a 39°C.

Figura 18: Fotomicrografías que ilustran la morfología de la placa de mutantes PR8 a diversas temperaturas. Se infectaron células MDCK con virus tal como se ha indicado y se incubaron a 33, 37 y 39°C durante tres días. Se visualizaron las placas de virus mediante inmunotinción y se fotografiaron.

Figura 19: Síntesis de proteínas a temperaturas permisivas y no permisivas. Se infectaron células MDCK con virus tal como se ha indicado y se incubaron a 33 o 39°C durante la noche. Se sometieron a electroforesis los polipéptidos marcados radiomarcados en un SDS-PAGE y se autoradiografiaron. Se indican las proteínas víricas, HA, NP, M1 y NS.

Figura 20: A. Gráficos de líneas que ilustran la replicación diferencial de MDV-A y MDV-B en células Per.C6 con respecto a la replicación en células MDCK; B. Gráfico de líneas que ilustra la replicación diferencial de los genomas reordenados del gen único de MDV-A en células Per.C6.

Figura 21: Gráfico de barras que ilustra la replicación diferencial de virus con genoma reordenado. Los recuadros en gris representan restos de aminoácidos naturales. La línea punteada representa la temperatura de corte (ts) de 2,0 log₁₀.

Figuras 22-23: Comparación antigénica de un tipo A/Panama/99 (H3N2) y un tipo A/Fujian/411 (H3N2).

Figuras 24-28. Muestra la base molecular de la deriva antigénica del tipo A/Panama/99 y el tipo A/Fujian/02.

Figuras 29-35: Modificaciones de detalle en las cepas para producir un aumento en el crecimiento del virus en huevos con embrión.

Figura 36: Afinidad de unión al receptor HA de virus recombinantes. Se adsorbieron las variantes A/Fujian 6:2, A/Sendai, A/Wyoming y A7Fujian con cambios en V186 y 1226 o L138 y A226 en células MDCK a una *moi* de 1,0 a 4°C o 33°C durante 30 min, y se lavaron las células infectadas tres veces (+) o se dejaron sin tratar (-). Después de 6 h de incubación a 33°C, se procesaron las células para la tinción de inmunofluorescencia. El porcentaje de células infectadas (promedio \pm DS) indicado en cada imagen fue un promedio de seis imágenes.

Figura 37: Cinética de crecimiento de virus recombinantes en células MDCK. Se infectaron células MDCK a una *moi* de 1,0 a tanto 33°C como 4°C durante 30 min, se lavaron 3x con PBS. Se incubaron las células infectadas a 33°C y a los intervalos de tiempo indicados se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se determinó la cantidad de virus mediante ensayo en placa.

Figura 38: Emplazamientos de unión al receptor en los subtipos HA y NA de H3N2. Se indicaron los restos que se demostró que aumentaban la afinidad de unión al receptor de HA y disminuían la actividad enzimática de NA en relación con los emplazamientos de unión al ácido siálico (SIA). Se modeló el monómero de HA usando 5HMG y se modeló el monómero basado en 2BAT usando WebLab ViewerLife 3.10 (Accelrys, San Diego, CA).

Descripción detallada

Muchas cepas patógenas del virus de la gripe crecen bastante mal en cultivos de tejido, y las cepas adecuadas para la producción de vacunas de virus atenuados vivos (por ejemplo, virus de la gripe sensibles a la temperatura, adaptados al frío y/o atenuados) no han crecido satisfactoriamente en células cultivadas para la producción comercial. Un estímulo adicional en el desarrollo y la producción de vacunas de la gripe es que una o más de las cepas de la gripe circulantes pueden no replicarse bien en huevos embrionarios de pollo. Se han identificado diversos restos de aminoácidos que tienen influencia sobre las actividades de las proteínas HA y NA, en la medida en que tienen sustituciones específicas de aminoácidos que pueden modular estas actividades. La modulación de la actividad de unión al receptor HA y/o la actividad de la neuraminidasa NA pueden potenciar la replicación de la gripe en huevos y/o células huéspedes (*por ejemplo*, células Vero o MDCK). Específicamente, las combinaciones de sustituciones de aminoácidos en HA y/o NA pueden potenciar la replicación vírica en huevos y/o células y demuestran que estas sustituciones de aminoácidos no tienen impacto significativo sobre la antigenicidad de estos virus de la gripe recombinantes. De esta manera, se puede usar tecnología genética inversa para mejorar la producción de vacunas del virus de la gripe.

Los procedimientos de la invención proporcionan vectores y procedimientos para producir virus de la gripe B recombinante completamente a partir de ADN vírico clonado. En otros aspectos, los procedimientos de la presente invención se basan en parte en el desarrollo de condiciones de cultivo de tejido que soportan el crecimiento de las cepas de virus (virus de la gripe de cepa A y cepa B) con propiedades deseables en relación con la producción de vacunas (por ejemplo, patogenicidad o fenotipo atenuado, adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, etc) *in vitro* en células cultivadas. Los virus de la gripe se producen introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan segmentos de genoma vírico clonados en las células huéspedes, y cultivando las células a una temperatura que no exceda los 35°C. Cuando se transfectan vectores que incluyen el genoma de un virus de la gripe, se pueden recuperar virus recombinantes adecuados como vacunas mediante procedimientos de purificación normalizados. Usando el sistema del vector y los procedimientos de la invención, se pueden producir rápida y eficazmente virus de genoma reordenado que incorporan los seis segmentos génicos internos de una cepa seleccionada por sus propiedades deseables con respecto a la producción de vacuna, y los segmentos inmunógenos HA y NA procedentes, *por ejemplo*, una cepa patógena en cultivos de tejido de esta manera, el sistema y los procedimientos descritos en el presente documento son útiles para la producción rápida en cultivo celular de virus de la gripe A y B recombinantes y de genoma reordenado, incluyendo virus adecuados para uso en vacunas, incluyendo vacunas atenuadas vivas, tales como vacunas adecuadas para la administración intranasal.

Normalmente, se selecciona una cepa única de Virus Donante Maestro (MDV) para cada uno de los subtipos A y B. En el caso de una vacuna atenuada viva, la cepa de Virus Donante Maestro se escoge por sus propiedades favorables, por ejemplo, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación, en relación con la producción de vacunas. Por ejemplo, las Cepas Donantes Maestras incluyen cepas sensibles a la temperatura, atenuadas y adaptadas al frío de A/Ann Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66, respectivamente. La presente invención elucida las mutaciones subyacentes que dan como resultado los fenotipos ca, ts y att, de estas cepas de virus, y proporciona procedimientos para producir novedosas cepas de gripe adecuadas para el uso como cepas donantes en el contexto de la producción de vacunas recombinantes y de genoma reordenado.

Por ejemplo, un virus donante maestro de tipo A (MDV-A), o un virus donante maestro de tipo B (MDV-B), se produce a partir de una pluralidad de ADNc víricos clonados que constituyen el genoma vírico. En una forma de realización a modo de ejemplo, se producen los virus recombinantes a partir de ocho ADNc víricos clonados. Los ocho ADNc víricos que representan cualquiera de las secuencias seleccionadas de MDV-A o MDV-B de PB2, PB1, PA, NP,

HA, NA, M y NS se clonan en un vector de expresión bidireccional, tal como un plásmido (por ejemplo, pAD3000), de tal manera que se puede transcribir el ARN genómico vírico a partir de un promotor de la ARN polimerasa I (pol I) a partir de una cepa y se pueden sintetizar los ARNm víricos a partir de un promotor de la ARN polimerasa II (pol II) a partir de la otra cepa. Opcionalmente, se puede modificar cualquier segmento, incluyendo el segmento HA (por ejemplo para eliminar el emplazamiento de excisión multibásico).

A continuación se recuperan los virus MDV-A o MDV-B recombinantes infecciosos tras la transfección de los plásmidos que soportan los ocho ADNc víricos en las células huéspedes apropiadas, por ejemplo, células vero. Usando los plásmidos y los procedimientos descritos en el presente documento, la invención es útil, por ejemplo, para generar vacunas de la gripe de genoma reordenado 6:2 mediante la transfección simultánea de los 6 genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) de los virus seleccionados (por ejemplo, MDV-A, MDV-B) junto con HA y la NA derivados de diferentes tipos correspondientes de virus de la gripe (A o B). Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B patológicamente relevante, tal como se lleva a cabo rutinariamente para la producción de vacunas. Similarmente, se puede seleccionar el segmento HA a partir de una cepa con relevancia emergente como una cepa patógena tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). Se pueden producir también genomas reordenados que incorporan siete segmentos de genoma del MDV y cualquiera del gen HA o NA de una cepa seleccionada (genomas reordenados 7:1). Adicionalmente, este sistema es útil para determinar la base molecular de las características fenotípicas, por ejemplo, los fenotipos atenuados (att), adaptados al frío (ca), y sensibles a la temperatura (ts), relevantes para la producción de vacunas.

Definiciones

A no ser que se defina otra cosa, se entiende que todos los términos científicos y técnicos tienen el mismo significado que se usan comúnmente en la técnica a la cual pertenecen. A objeto de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Los términos “ácido nucleico”, “polinucleótido”, “secuencia de polinucleótidos” y “secuencia de ácidos nucleicos” se refieren a polímeros de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos de cadena única o doble cadena, o quimeras o sus análogos. Tal como se usa en el presente documento, el término incluye opcionalmente polímeros de los análogos de nucleótidos que se producen naturalmente que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales en que hibridan a los ácidos nucleicos de cadena única de una manera similar a la de los nucleótidos que se producen naturalmente (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). A no ser que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico concreta de esta invención abarca la secuencia complementaria, adicionalmente a la secuencia explícitamente indicada.

El término “gen” se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico indicado asociado con una función biológica. De esta manera, los genes incluyen secuencias de codificación y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. El término “gen” se aplica a una secuencia genómica específica, así como al ADNc o un ARNm codificado por la secuencia genómica.

Los genes incluyen también segmentos de ácido nucleico no expresado que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento de otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen “promotores” y “potenciadores”, a las cuales se unen proteínas reguladoras tales como fragmentos de unión de la transcripción, dando como resultado la transcripción de secuencias adyacentes o próximas. Un promotor o potenciador “específico de tejido” es uno que regula la transcripción en un tipo de tejido, tipo de célula, o tipos específicos.

El término “vector” se refiere a los medios por los cuales se puede propagar y/o transferir un ácido nucleico entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones, y cromosomas artificiales, y similares, que se replican autónomamente o se pueden integrar en un cromosoma de una célula huésped. Un vector puede ser también un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto por ADN y ARN en el interior de la misma cadena, un ADN o ARN conjugado con polilisina, un ADN o ARN conjugado con péptido, un ADN conjugado con liposoma, o similar, que no se replican autónomamente. Más comúnmente, los vectores de la presente invención son plásmidos.

Un “vector de expresión” es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el anterior. Normalmente, el ácido nucleico que se va expresar se “une de manera operable” con un promotor y/o potenciador, y está sujeto a control regulador de la transcripción por el promotor y/o el potenciador.

Un “vector de expresión bidireccional” se caracteriza normalmente por dos promotores alternativos orientados en la dirección opuesta con respecto a un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de tal manera que se puede iniciar la expresión en ambas orientaciones dando como resultado, por ejemplo, la transcripción ARN de cadena más (+) o de sentido directo, y de cadena negativa (-) o de sentido contrario. Alternativamente, el vector de expresión bidireccional puede ser un vector de ambos sentidos, en el que el ARNm vírico y el ARN genómico vírico (como el ARNc) se expresan a partir de la misma cadena.

En el contexto de la invención, el término “aislado” se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con éste en su ambiente en el que se produce naturalmente. El material aislado comprende opcionalmente material que no

se encuentra con el material en su ambiente natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su ambiente natural, tal como una célula, el material se ha colocado en una localización en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no natural para un material que se encuentra en este ambiente. Por ejemplo, un ácido nucleico que se produce naturalmente (por ejemplo, una secuencia de codificación, un promotor, un potenciador, etc) llega a aislarse si se introduce por medios que no se producen naturalmente en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, tal como un vector plásmido o de virus, o amplicón) no natural al de este ácido nucleico. Dichos ácidos nucleicos se denominan también como ácidos nucleicos “heterólogos”.

El término “recombinante” indica que el material (por ejemplo un ácido nucleico o proteína) se ha alterado artificial o sintéticamente (no naturalmente) mediante intervención humana. Se puede llevar a cabo la alteración sobre el material dentro, o eliminarse de, su ambiente o estado natural. Específicamente, cuando se refiere a un virus, por ejemplo, un virus de la gripe, el virus es recombinante cuando se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

El término “de genoma reordenado”, cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye, componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa o fuente de virus parental. Por ejemplo, un genoma reordenado 7:1 incluye 7 segmentos genómicos víricos (o segmentos génicos) derivados de un primer virus parental, y un segmento genómico vírico complementario único, que codifica, por ejemplo, hemaglutinina o neuraminidasa, procedente de un segundo virus parental. Un genoma reordenado 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, más comúnmente 6 genes internos procedentes de un virus parental, y dos segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, procedentes de un virus parental diferente.

El término “introducido”, cuando se refiere a un ácido nucleico heterólogo o aislado, se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en la que se puede incorporar el ácido nucleico en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye los mencionados procedimientos tales como “infección”, “transfección”, “transformación” y “transducción”. En el contexto de la invención, se pueden emplear una variedad de procedimientos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas, que incluyen la electroporación, la precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

El término “célula huésped” significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y soporta la replicación y/o la expresión del ácido nucleico, y opcionalmente la producción de uno o más productos codificados que incluyen un polipéptido y/o un virus. Las células pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levaduras, insectos, anfibios, aves o mamíferos, incluyendo células humanas. Las células huéspedes a modo de ejemplo en el contexto de la invención incluyen células Vero (de riñón de mono verde africano), células Per.C6 (células retinales embrionarias humanas), células BHK (de riñón de cría de hámster), células primarias de riñón de pollo (PCK), células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS (por ejemplo, células COS1, COS7). El término célula huésped abarca las combinaciones o las mezclas de células que incluyen, por ejemplo, cultivos mixtos de diferentes tipos de células o líneas celulares.

Se conocen bien en la técnica los términos “sensible a la temperatura”, “adaptado al frío” y “atenuado”. Por ejemplo, el término “sensible a la temperatura” (“ts”) indica que el virus presenta una reducción de 100 veces o más en el título a 39°C con respecto a los 33°C para las cepas de la gripe A, y que el virus presenta una reducción de 100 veces o más en el título a 37°C con respecto a los 33°C para las cepas de la gripe B. Por ejemplo, el término “adaptado al frío” (“ca”) indica que el virus presenta crecimiento a 25°C comprendido dentro de las 100 veces de su crecimiento a 33°C por ejemplo, el término “atenuado” (“att”) indica que el virus se replica en las vías aéreas superiores de los hurones pero no es detectable en tejidos pulmonares y no produce enfermedad del tipo de la gripe en el animal. Deberá entenderse que los virus con fenotipos intermedios, es decir, los virus que presentan reducciones del título inferiores de 100 veces a 39°C (para los virus de la cepa A) o 37°C (para los virus de la cepa B), que presentan crecimiento a 25°C que es mayor de las 100 veces su crecimiento a 33°C (comprendido, por ejemplo, dentro de las 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 10.000 veces menos), y/o que presentan crecimiento reducido en los pulmones con respecto al crecimiento en las vías aéreas superiores de los hurones (es decir, parcialmente atenuado) y/o enfermedad del tipo de la gripe reducida en el animal, que posee una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento, son también virus útiles abarcados por la invención. El crecimiento indica la cantidad vírica que se indica por el título, el tamaño o la morfología de la placa, la densidad de partículas u otras medidas conocidas por las personas expertas en la técnica.

La expresión “construido artificialmente mediante ingeniería genética” se usa en el presente documento para indicar que el virus, el ácido nucleico vírico o el producto codificado víricamente, por ejemplo, un polipéptido, una vacuna, comprende al menos una mutación introducida mediante procedimientos recombinantes, por ejemplo, mutagénesis dirigida al emplazamiento, mutagénesis mediante la PCR, etc. La expresión “construido artificialmente mediante ingeniería genética” cuando se refiere a un virus (o un componente o producto vírico) que comprende una o más mutaciones de nucleótidos y/o sustituciones de aminoácidos, indica que el genoma vírico o el segmento genómico que codifica el virus (o el componente o producto vírico) no se deriva de fuentes que se producen naturalmente, tales como la cepa de virus de laboratorio que se produce naturalmente o anteriormente existente producida mediante procedimientos no recombinantes (tal como el paso progresivo a 25°C), por ejemplo, una cepa A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66 natural o adaptada al frío.

Virus de la gripe

El genoma de los virus de la gripe está compuesto por ocho segmentos lineales de ácido ribonucleico (ARN) de cadena lineal (-) que codifican las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) inmunógenas, y seis péptidos de núcleo interno; la nucleocápsida, la nucleoproteína (NP); las proteínas de la matriz (M); las proteínas no estructurales (NS); y 3 proteínas ARN polimerasas (PA, PB1, PB2). Durante la replicación, el ARN vírico genómico se transcribe en el ARN mensajero de la cadena (+) y el ARNc genómico de la cadena (-) en el núcleo de la célula huésped. Cada uno de los ocho segmentos genómicos está empaquetado en complejos de ribonucleoproteínas que contienen, adicionalmente al ARN, NP y un complejo de la polimerasa (PB1, PB2, y PA).

En la presente invención, el ARN genómico que corresponde a cada uno de los ocho segmentos se inserta en un vector recombinante para la manipulación y la producción de los virus de la gripe. Se pueden emplear una variedad de vectores, incluyendo vectores víricos, plásmidos, cósmidos, fagos, y cromosomas artificiales, en el contexto de la invención. Normalmente, para facilitar la manipulación, los segmentos genómicos víricos se insertan en un vector plásmido, proporcionando uno o más orígenes de replicación funcionales en las células bacterianas y eucariotas, y, opcionalmente, un marcador conveniente, para cribar o seleccionar las células que incorporan la secuencia del plásmido. Se ilustra en la Figura 1 un vector a modo de ejemplo, el plásmido pAD3000.

Más comúnmente, los vectores plásmidos de la invención son vectores de expresión bidireccional capaces de iniciar la transcripción del segmento genómico vírico insertado en cualquier dirección, esto es, proporcionando un aumento de las moléculas de ARN vírico de la cepa (+) y la cepa (-). Para efectuar la transcripción bidireccional, cada uno de los segmentos genómicos víricos se inserta en un vector que tiene al menos dos promotores independientes, de tal manera que se transcriben copias del ARN genómico vírico mediante un primer promotor de la ARN polimerasa (por ejemplo, Pol I) procedente de una cadena, y se sintetizan ARNm víricos procedentes de un segundo promotor de la ARN polimerasa (por ejemplo, Pol II). De acuerdo con esto, los dos promotores se disponen en orientaciones opuestas que flanquean al menos un emplazamiento de clonación (es decir, una secuencia de reconocimiento del enzima de restricción), preferiblemente un único emplazamiento de clonación, adecuado para la inserción de los segmentos de ARN genómico vírico. Alternativamente, se puede emplear un vector en ambos sentidos en el que el ARNm de la cadena (+) y el ARN vírico de la cadena (-) (como ARNc) se transcriben a partir de la misma cadena del vector.

Vectores de expresión

El segmento del genoma del virus de la gripe que se va a expresar se une de manera operable a una secuencia control de la transcripción apropiada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Son adecuados una variedad de promotores para uso en los vectores de expresión para regular la transcripción de los segmentos del genoma del virus de la gripe. En algunas formas de realización, por ejemplo, en las que el vector es el plásmido pAD3000, se utiliza el promotor de la ARN Polimerasa (Pol II) dependiente del ADN de citomegalovirus (CMV). Si se desea, por ejemplo, para regular la expresión condicional, se pueden sustituir otros promotores que inducen la transcripción del ARN, en las condiciones especificadas, o en los tejidos o células especificados. Están disponibles numerosos promotores víricos y de mamíferos, por ejemplo, de seres humanos, o se pueden aislar de acuerdo con la aplicación específica contemplada. Por ejemplo, los promotores alternativos obtenidos de los genomas de virus animales o humanos incluyen los mencionado promotores tales como los promotores de adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma, virus de la hepatitis-B, virus del poliovirus, Virus 40 de Simios (SV-40), y diversos promotores retrovíricos. Los promotores de mamíferos incluyen, entre otros muchos, el promotor de la actina, los promotores de la inmunoglobulina, los promotores del choque térmico, y similares. Adicionalmente, se pueden emplear promotores de bacteriófagos en conjunción con la ARN polimerasa análoga, por ejemplo el promotor T7.

Se aumenta opcionalmente la transcripción incluyendo una secuencia potenciadora. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en CIS, normalmente cortos, por ejemplo, de 10-500 pb, que actúan en concierto con un promotor para aumentar la transcripción. Se han aislado muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (hemoglobina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina), y virus de células eucariotas. Se puede cortar y empalmar el potenciador en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia heteróloga de codificación, pero se inserta normalmente en el emplazamiento 5' del promotor. Normalmente, el promotor, y si se desea, las secuencias adicionales que potencian la transcripción, se escogen para optimizar la expresión en el tipo de célula huésped en el que se va a introducir el ADN heterólogo (Scharf y col. (1994) Heat stress promoters and transcription factor Results Probl Cell Differ 20:125-62; Krigler y col (1990) Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes methods in Enzymol 185: 512-27. Opcionalmente, el amplicón puede contener también un emplazamiento de unión al ribosoma o un emplazamiento interno de entrada al ribosoma (IRES) para el inicio de la traducción.

Los vectores de la invención incluyen también favorablemente las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para estabilizar el ARNm, tales como un emplazamiento de poliadenilación o una secuencia finalizadora. Dichas secuencias están disponibles comúnmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente las 3' de los ADN o ADNc eucariotas o víricos. En una forma de realización, que implica, por ejemplo, el plásmido pAD3000, las secuencias de poliadenilación de SV40 proporcionan una señal de poliadenilación.

Además, tal como se describe anteriormente, los vectores de expresión incluyen opcionalmente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huéspedes transforma-

doras, adicionalmente a los genes anteriormente relacionados, marcadores tales como la dihidrofolato reductasa o de resistencia a la neomicina son adecuados para la selección en cultivos celulares eucariotas.

Se pueden emplear, el vector que contiene la secuencia apropiada de ADN tal como se describe anteriormente, así como un promotor o secuencia control apropiados, para transformar una célula huésped permitiendo la expresión de la proteína. Mientras que los vectores de la invención se pueden replicar en células bacterianas, más frecuentemente, será deseable introducirlos en células de mamíferos, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293, células COS, con objeto de la expresión.

Elementos adicionales de la expresión

Más comúnmente, el segmento de genoma que codifica la proteína del virus de la gripe incluye cualquier secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo la traducción en una proteína vírica funcional. En otras situaciones, se puede emplear un minigen, u otras construcciones artificiales que codifican las proteínas víricas, por ejemplo una proteína HA o NA. En este caso, es a menudo deseable incluir señales de inicio específicas que ayuden a la traducción eficaz de la secuencia heteróloga de codificación. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. Para asegurar la traducción de la inserción completa, se inserta el codón de inicio en el marco de lectura correcto con respecto a la proteína vírica. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, naturales y sintéticos. Se puede potenciar la eficacia de la expresión mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso.

Si se desea, se pueden incorporar secuencias de polinucleótidos que codifican elementos expresados adicionales, tales como secuencias señal, secuencias de secreción o localización, y similares, en el vector, normalmente, en marco con la secuencia de polinucleótidos de interés, por ejemplo, para dirigir la expresión polipeptídica en un compartimento, membrana, u orgánulo celular deseado, o en los medios de cultivo. Las personas expertas en la técnica conocen dichas secuencias, e incluyen los péptidos líderes secretores, las secuencias que dirigen los orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización celular, señales de retención ER, secuencias de tránsito mitocondrial), secuencias de localización/anclaje de la membrana (por ejemplo, secuencias de detención de la transferencia, secuencias de anclaje GPI) y similares.

Vacuna del virus de la gripe

Históricamente, se han producido vacunas del virus de la gripe en huevos de gallina con embrión usando las cepas de virus seleccionadas basadas en predicciones empíricas de las cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus de genoma reordenado que incorporan antígenos seleccionados de la hemaglutinina y la neuraminidasa, en el contexto de una cepa maestra atenuada, sensible a la temperatura aprobada. Tras el cultivo de los virus mediante múltiples pasos en huevos de gallina, se recuperan virus de la gripe y, opcionalmente, inactivados, por ejemplo, usando formaldehído y β -propiolactona. Sin embargo, la producción de vacuna de la gripe de esta manera tiene diversos inconvenientes significativos. Los contaminantes que permanecen procedentes de los huevos de gallina son muy antigénicos, pirógenos, y dan como resultado frecuentemente efectos secundarios significativos tras la administración. Más importante, deben seleccionarse y distribuirse las cepas designadas para la producción, normalmente con meses de adelanto a la próxima estación de la gripe para dejar tiempo para la producción y la inactivación de la vacuna de la gripe. Los intentos de producir vacunas recombinantes y de genoma reordenado en cultivos celulares han sido obstaculizados por la incapacidad de cualquiera de las cepas aprobadas para la producción de vacunas de crecer eficazmente en condiciones normalizadas de cultivo celular.

La presente invención proporciona procedimientos para producir virus recombinantes y de genoma reordenado en cultivo, lo cual hace posible producir rápidamente vacunas que corresponden a una o muchas cepas antigénicas de virus seleccionados. En particular, se proporcionan condiciones y cepas que dan como resultado una eficaz producción de virus a partir de un sistema multiplásmido en cultivo celular. Opcionalmente, si se desea, se pueden amplificar adicionalmente los virus en huevos de gallina.

Por ejemplo, no ha sido posible hacer crecer la cepa B/Ann Arbor/1/66 maestra de la gripe B en condiciones normalizadas de cultivo celular, por ejemplo, a 37°C. En los procedimientos de la presente invención, se introducen múltiples plásmidos, incorporando cada uno un segmento del genoma de un virus de la gripe en células adecuadas, y manteniéndose en cultivo a una temperatura inferior de o igual a 35°C. Normalmente, los cultivos se mantienen a entre aproximadamente 32°C y 35°C, preferiblemente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

Normalmente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como una estufa de cultivos celulares, a humedad y CO₂ controlados, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para asegurar que la temperatura no exceda de 35°C.

Se pueden obtener fácilmente virus de la gripe de genoma reordenado introduciendo un subconjunto de vectores correspondientes a segmentos genómicos de un virus de la gripe maestro, en combinación con los segmentos complementarios derivados de las cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de interés). Normalmente, las cepas maestras se seleccionan sobre la base de propiedades relevantes deseables para la administración de la vacuna. Por ejemplo, para la producción de la vacuna, por ejemplo, para la producción de una vacuna atenuada viva. Se puede

seleccionar la cepa de virus donante maestros para un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura. En este contexto, la cepa A/Ann Arbor/6/60 ca de la gripe A; la cepa Blank Arbor/1/66 ca de la gripe B; o se seleccionan favorablemente otras cepas seleccionadas por sus propiedades fenotípicas deseables, por ejemplo, una cepa atenuada, adaptada al frío, y/o sensible a la temperatura, tal como una cepa de la gripe A construida artificialmente mediante ingeniería genética tal como se describe en el Ejemplo 4; o una cepa de la gripe B construida artificialmente mediante ingeniería genética que incorpora una o más de las sustituciones de aminoácidos especificadas en la Tabla 17, como cepas donantes maestras.

En una forma de realización, los plásmidos que incorporan seis genes internos de la cepa maestra del virus de la gripe, (es decir, PB1, PB2, PA, NP, M1, BM2, NS1 y NS2) se transfectan en células huéspedes adecuadas en combinación con segmentos de hemaglutinina y neuraminidasa a partir de una cepa antigénicamente deseable, por ejemplo, una cepa predicha por producir infección de la gripe local o global significativa. Tras la replicación del virus de genoma reordenado en un cultivo celular a las temperaturas apropiadas para la recuperación eficaz, por ejemplo, igual a o inferior de 35°C, tal como entre aproximadamente 32°C y 35°C, por ejemplo entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, o a aproximadamente 33°C, se recuperan lo virus de genoma reordenado. Opcionalmente, se puede inactivar el virus recuperado usando un agente desnaturizante tal como formaldehído o β -propiolactona.

Vacunas del virus de la gripe atenuadas, sensibles a la temperatura y adaptadas al frío

Para determinar la importancia funcional de los cambios de nucleótidos únicos en el genoma de la cepa MDV, se evaluaron los virus derivados de cepas muy relacionadas dentro del linaje A/AA/60 para la sensibilidad a la temperatura. La naturaleza isógena de las dos cepas parentales permite la evaluación de cambios de nucleótidos únicos en el fenotipo ts. De acuerdo con esto, se mapea la base genética del fenotipo ts de MDV-A al nivel del nucleótido en los restos de aminoácidos específicos en el interior de PB1, PB2, y NP.

Intentos anteriores de mapear la base genética del fenotipo ts de A/AA/6160 ca utilizaron técnicas clásicas de infección simultánea/reordenación de genoma para crear genomas reordenados de múltiples genes entre A/AA/6/60 y una cepa natural no relacionada. Estos estudios sugirieron que PB2 y PB1 contribuyeron al fenotipo ts (Kendal y col. (1978) Biochemical characteristics of recombinant viruses derived at sub-optimal temperatures: evidence that ts lesions are present in RNA segments 1 and 3, and that RNA 1 codes for the virión transcriptase enzyme, p. 734-743. En B. W. J. Mahy, y R. D. Barry (ed) Negative Strand Viruses, Academic Press; Kendal y col. (1977). Comparative studies of wild-type and cold mutant (temperature sensitive) influenza viruses; genealogy of the matrix (M) and the non-structural (NS) proteins in recombinant cold-adapted H3N2 viruses J Gen Virol 37: 145-159; Kendal y col. (1979) Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature sensitive) influenza viruses: independent segregation of temperature-sensitivity o virus replication from temperature-sensitivity of virión transcriptase activity during recombination of mutant A/Ann Arbor/6/60 with wild-type H3N2 strains J Gen Virol 44: 4443-4560; Synder y col. (1988) Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines J Virol 62:488-95). La interpretación de Estos estudios, sin embargo, se confundió por los efectos de constelación, que se produjeron por la mezcla de segmentos génicos procedentes de las dos cepas de gripe A divergentes. Podrían haber ocurrido débiles interacciones a través de cambios los segmentos de A/AA/6/60 y el gen natural, diferentes de los específicamente implicados en la expresión del fenotipo ts procedentes del fondo de A/AA/6/60. Se mostró también que los efectos de constelación confundían la interpretación de la asociación del segmento génico M con el fenotipo att (Subbarao y col (1992) The attenuation phenotype conferred by the M gene of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted virus (H2N2) on the A/Korea/82 (H3N2) reassortant virus results from a gene Constellation effect Virus Res 25:37-50).

Las mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácidos en las posiciones PB1³⁹¹, PB1⁵⁹¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵, y NP³⁴ se identificaron como funcionalmente importantes en conferir el fenotipo sensible a la temperatura en el virus de la cepa MDV-A. Así como una persona experta en la técnica entenderá, las mutaciones de nucleótidos en las posiciones PB1¹¹⁹⁵, PB1¹⁷⁶⁶, PB1²⁰⁰⁵, PB2⁸²¹ y NP¹⁴⁶ designan sustituciones de aminoácidos en PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, respectivamente. De esta manera, es una característica de la invención cualquier sustitución de nucleótidos que da como resultado aminoácidos sustituidos en estas posiciones. Las mutaciones a modo de ejemplo PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34g), únicamente, y más preferiblemente en combinación, dan como resultado un fenotipo sensible a la temperatura. La reversión simultánea de estas mutaciones al tipo natural suprime el fenotipo ts, mientras que la introducción de estas mutaciones sobre un fondo natural da como resultado un virus con fenotipo ts. Consistente con la estabilidad de estos fenotipos durante el paso del virus, no se puede revertir individualmente con un único cambio el perfil de sensibilidad a la temperatura del virus resultante al del natural. Más bien, estos cambios parecen actuar en concierto con otros para expresar completamente el fenotipo ts. Este descubrimiento permite la construcción mediante ingeniería genética de cepas adicionales de virus de la gripe A sensibles a la temperatura adecuados para virus donantes maestros para la producción de vacunas de la gripe atenuadas vivas.

Similarmente, se correlacionaron las sustituciones de aminoácidos individuales en una cepa B de Virus Donante maestro con el fenotipo ts, tal como se ilustra en la Tabla 17. De esta manera, se adaptan los procedimientos presentados en el presente documento para producir novedosas cepas de la gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura, y opcionalmente atenuados y/o adaptados al frío introduciendo una o más mutaciones especificadas en un genoma de la gripe B. Por ejemplo, se introdujeron una o más mutaciones que dieron como resultado sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada de entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³ en un genoma de

la cepa de la gripe B para producir un virus de la gripe B sensible a la temperatura. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen las siguientes: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V).

- 5 Las cepas de la gripe incluyen, por ejemplo, cualquier virus de la gripe A con una sustitución de aminoácidos con respecto al natural en una o más posiciones seleccionadas de entre PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ o cualquier virus de la gripe B con una sustitución de aminoácidos con respecto al natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: PB2⁶³⁰; PA⁴³¹; PA⁴⁹⁷; NP⁵⁵; NP¹¹⁴; NP⁴¹⁰; NP⁵⁰⁹; M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³, con la condición de que las cepas A/Ann Arbor/6/60 ca y B/Ann Arbor/1/66 no se consideren una característica de la presente invención, se pueden producir mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización preferidas, los virus de la gripe A incluyen una pluralidad de mutaciones (por ejemplo, dos, o tres, o cuatro, o cinco, o más mutaciones) seleccionadas de entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y los virus de la gripe B incluyen una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V), respectivamente. Por ejemplo, adicionalmente a proporcionar virus con los fenotipo deseados relevantes para la producción de vacunas, los virus con un conjunto de mutaciones, por ejemplo, 1, ó 2, ó 3, ó 4, ó 5 mutaciones seleccionadas, son útiles en la elucidación de la contribución de mutaciones adicionales en el fenotipo de los virus. En algunas formas de realización, los virus de la gripe incluyen al menos un nucleótido adicional no natural (por ejemplo, resultante posiblemente de una sustitución adicional de aminoácidos), que clarifica el fenotipo deseado o confiere un atributo fenotípico adicional deseable.

Replicación vírica potenciada

- La presente invención proporciona también procedimientos que se pueden usar par introducir al menos una sustitución en un resto de aminoácido en HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus de la gripe de replicarse en huevos con embrión de pollo y/o células huéspedes. Pueden por tanto producirse variantes del virus de la gripe con capacidad aumentada para replicarse en huevos con embrión de pollo y/o células huéspedes (denominadas en el presente documento como “variantes de replicación potenciada”) cuando se comparan con el virus de la gripe no sustituido en HA y/o NA. Se contempla específicamente que se pueda utilizar el procedimiento de la invención para potenciar la replicación de un virus de la gripe en una célula huésped y que las variantes de replicación potenciada puedan tener replicación potenciada en huevos de pollo y/o células huéspedes. Las células huéspedes adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7.

- En una forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir a menos una sustitución de aminoácidos en HA y/o NA que potenciará la capacidad de un virus de la gripe de replicarse en huevos y/o células huéspedes en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%, o en al menos un 300%, o en al menos un 400%, o en al menos un 500% cuando se compara con un virus de la gripe no modificado. Se contempla específicamente que se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en HA y NA. Preferiblemente, el procedimiento de la invención no altera significativamente la antigenicidad del virus de la gripe sustituido cuando se compara con el virus no sustituido. En una forma de realización específica, el procedimiento de la invención reduce la antigenicidad del virus de la gripe sustituido cuando se compara con el virus no sustituido en menos de un 10%, o en menos de un 20%, o en menos de un 30%, o en menos de un 40% o en menos de un 50%, o en menos de un 60%, o en menos de un 70%, o en menos de un 80%, o en menos de un 90%, o en menos de un 100%. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para determinar la antigenicidad vírica (véase también, “Ejemplo 11” *más arriba*).

- En una forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para incorporar adicionalmente un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas propiedades deseables. Preferiblemente, los virus incorporados mediante el procedimiento de la invención incluyen, pero no se limitan a, virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de la gripe, virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de la gripe. En otra forma de realización, el procedimiento de la invención introduce vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa vírica seleccionada por sus propiedades favorables con respecto a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos del genoma que codifican los antígenos superficiales de HA y NA manipulados deseados para producir virus de la gripe con capacidad potenciada para replicarse en huevos con embrión de pollo y/o células huéspedes (véase, *más arriba* y “Ejemplo 11”).

- En una forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir al menos una sustitución de aminoácidos que module la actividad de unión al receptor de HA. La actividad de unión al receptor de HA incluye, pero no se limita a la unión de HA a restos de ácido siálico (por ejemplo, restos de sialil-galactosil 2,6 unidos [Siaα(2,6)Gal] y restos de sialil-galactosil 2,3 unidos [Siaα(2,3)Gal] presentes en las glicoproteínas o glicolípidos superficiales celulares. En el “Ejemplo 11” (*más abajo*) se presenta un procedimiento para ensayar la unión a HA, se conocen bien en la técnica otros procedimientos. En otra forma de realización, el procedimiento de la invención introduce sustituciones de aminoácidos que modulan la especificidad de unión al receptor de HA para restos [Siaα(2,6)Gal] y/o [Siaα(2,3)Gal]. Preferiblemente, el procedimiento potenciará la unión de HA a restos [Siaα(2,3)Gal].

ES 2 345 492 T3

En una forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir al menos una sustitución de aminoácidos que potencie la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor está aumentada en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

En otra forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir al menos una sustitución de aminoácidos que reduzca la actividad de unión de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor está reducida en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

En una forma de realización preferida, se puede usar el procedimiento para introducir al menos una sustitución de aminoácidos en HA en las posiciones 183, 186 y/o 226. Preferiblemente, se hacen las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 183 y 226 o en la posiciones 185 y 226. Más preferiblemente, se hacen las sustituciones de aminoácidos de tal manera que la posición 183 es una leucina y la posición 226 es una alanina o de tal manera que la posición 186 es una valina y la posición 226 es una isoleucina.

En una forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir al menos una sustitución de aminoácidos que module la actividad neuraminidasa de NA. La actividad neuraminidasa de NA incluye, pero no se limita a, la hidrólisis de sustratos que contienen ácido N-acetilneuramínico unido alfaacetosídicamente (Neu5Ac). Se conocen bien en la técnica los procedimientos para determinar la actividad neuraminidasa (véase también, "Ejemplo 11" *más abajo*).

En una forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir al menos una sustitución de aminoácidos que potencie la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor está aumentada en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

En otra forma de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para introducir al menos una sustitución de aminoácidos que reduzca la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad neuraminidasa está reducida en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

En una forma de realización preferida, se puede usar el procedimiento para introducir al menos una sustitución de aminoácidos en NA en las posiciones 119 y/o 136. Preferiblemente, se hacen las sustituciones de aminoácidos de tal manera que la posición 119 es un glutamato y la posición 136 es una glutamina.

Una persona experta en la técnica apreciará que en algunos casos la proteína HA y/o NA tendrán ya los restos aminoácidos preferidos en una o más de las posiciones anteriormente mencionadas. En esta situación, se introducirán sustitución(es) únicamente en las restantes posiciones no correspondientes.

Se contempla específicamente que se pueden hacer sustituciones conservativas de aminoácidos para dichas sustituciones de aminoácidos en las posiciones 183, 186 y/o 226 de HA y en las posiciones 119 y/o 136 de NA, descritas *más arriba*.

Se conoce bien en la técnica que "sustituciones conservativas de aminoácidos" se refiere a las sustituciones de aminoácidos que sustituyen aminoácidos funcionalmente equivalentes. Los cambios conservativos de aminoácidos dan como resultado cambios silenciosos en la secuencia de aminoácidos del péptido resultante. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de polaridad similar actúan como equivalentes funcionales y dan como resultado una alteración silenciosa en el interior de la secuencia de aminoácidos del péptido. Se pueden considerar también sustituciones conservativas las sustituciones que son de carga neutra y que sustituyen un resto con un resto más pequeño incluso si los restos están en diferentes grupos (por ejemplo, sustitución de fenilalanina con la isoleucina más pequeña). Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias del mismo tipo. Las familias de sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a no polares (*por ejemplo*, Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro), polares no cargados (*por ejemplo*, Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys) cargados ácido/negativamente (*por ejemplo*, Asp, Glu), cargados básico/positivamente (*por ejemplo*, Arg, Lys, His), beta ramificados (*por ejemplo*, Thr, Val, Ile) restos que tienen influencia sobre la orientación de la cadena (*por ejemplo*, Gly, Pro) y aromáticos (*por ejemplo*, Trp, Tyr, Phe, His). El término "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere también al uso de análogos o variantes de aminoácidos. Se proporciona en Bowie y col., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitution", (1990, Science 247: 1306-10) la directriz que concierne a como realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas.

En una forma de realización, los procedimientos de la invención pueden proporcionar virus de la gripe modificados, denominados en el presente documento como "variante(s) de la gripe de replicación potenciada", que incorporan al menos una sustitución de aminoácidos en HA y/o NA que potencia su replicación en huevos con embrión de pollo

ES 2 345 492 T3

5 y/o células huéspedes cuando se compara con el virus de la gripe no modificado. Preferiblemente, la capacidad de una variante de la gripe de replicación potenciada de replicarse en huevos y/o células huéspedes se ha potenciado en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 96%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%, o en al menos un 300%, o en al menos un 400%, o en al menos un 500%, cuando se compara con el virus de la gripe no modificado.

10 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar además un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas propiedades deseables. Preferiblemente, el virus incorporado en una variante de la gripe de replicación potenciada incluye, pero no se limita a, virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de la gripe, virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de la gripe. Se contempla específicamente que se produce una variante de la gripe de replicación potenciada introduciendo vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa vírica seleccionada por sus propiedades favorables con respecto a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos del genoma que codifican los antígenos superficiales de HA y NA sustituidos deseados (véase, *más arriba* y “Ejemplo 11”).

20 Una variante de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos en HA que modula la actividad de unión al receptor de HA (véase más arriba). Preferiblemente, el procedimiento potenciará la unión de HA a restos [Siaα(2,3)Gal].

25 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que potencie la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor está aumentada en a menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 140%, o en al menos un 200%. Se contempla específicamente que un huevo que potencia la variante de la gripe no tiene significativamente alterada la antigenicidad vírica cuando se compara con el virus de la gripe no sustituido. En una forma de realización específica, una variante de la gripe de replicación potenciada tiene una antigenicidad que está reducida en menos de un 10%, o en menos de un 20%, o en menos de un 30%, o en menos de un 40%, o en menos de un 50%, o en menos de un 60%, o en menos de un 70%, o en menos de un 80%, o en menos de un 90%, o en menos de un 100% cuando se compara con el virus no sustituido. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para determinar la antigenicidad vírica (véase también, “Ejemplo 11” *más arriba*).

35 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se reduce en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

40 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos en HA en las posiciones 183, 186 y/o 226. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos están presentes en las posiciones 183 y 226 o en las posiciones 186 y 226. Más preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos están presentes de tal manera que la posición 83 es una leucina y la posición 226 es una alanina o de tal manera que la posición 186 es una valina y la posición 226 es una isoleucina.

45 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que modula la actividad neuraminidasa de NA (véase *más arriba*).

50 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que potencia la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor está aumentada en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

55 Una variante de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad neuraminidasa está reducida en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

60 Una variante de la gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos en NA en las posiciones 119 y/o 136. Preferiblemente, se hacen las sustituciones de aminoácidos de tal manera que la posición 119 es un glutamato y la posición 136 es una glutamina.

Cultivo celular

65 Normalmente, la propagación del virus se lleva a cabo en las composiciones de los medios en los que se cultivan comúnmente células Vero. Las células huéspedes adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7. Comúnmente, se emplean cultivos simultáneos que incluyen dos de las anteriores líneas celulares,

por ejemplo células MDCK y cualquiera de células 293T o COS en una relación, por ejemplo, de 1:1, para mejorar la eficacia de la replicación. Normalmente se cultivan las células en un medio de cultivo comercial normalizado, tal como medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero (por ejemplo, suero bovino fetal al 10%), o en medio libre de suero, a una humedad y concentración de CO₂ controladas adecuadas para mantener el pH tamponado neutro (por ejemplo, a pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para evitar el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomycin, etc, y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, suplementos adicionales para promover las características favorables de crecimiento, por ejemplo, tripsina, β -mercaptoetanol, y similares.

Se ha informado extensamente de los procedimientos para mantener células de mamíferos en cultivo, y las personas expertas en la técnica los conocen. Se proporcionan protocolos generales, por ejemplo, en Freshney (1983) *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*. Alan R. Liss, Nueva York; Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edinburgo; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemist, Work y Burdon* (eds). Elsevier, Ámsterdam. Los detalles adicionales con respecto a los Procedimientos en el Cultivo de tejidos de particular interés en la producción del virus de la gripe *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten y col. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for Vaccine preparation*. En Cohen y Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*, que se incorpora en el presente documento en su totalidad.. Adicionalmente, se determinan fácilmente las variaciones en dichos procedimientos adaptadas a la presente invención mediante experimentación rutinaria.

Se pueden cultivar células para la producción del virus de la gripe en medio conteniendo suero o libre de suero. En algún caso, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, es deseable hacer crecer las células huéspedes en condiciones libres de suero Se pueden cultivar las células a pequeña escala, por ejemplo, menos de 25 ml de medio, en tubos o matraces de cultivo o en grandes matraces con agitación, en botellas giratorias, o en perlas de microvehículo (por ejemplo, perlas de microvehículo de DEAE-Dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories, perlas de copolímero de estireno-trimetilamina, tale como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en matraces, botellas o cultivos en reactor. Las perlas de microvehículo son pequeñas esferas (en el intervalo de 100-200 micrómetros de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para el crecimiento de células adherentes por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un único litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas de microvehículo que proporcionan más de 8000 cm cuadrados de superficie de crecimiento. Para la producción comercial de virus, por ejemplo, para la producción de vacunas, es deseable a menudo cultivar las células en un biorreactor o fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes desde menos de 1 litro hasta de más de 100 litros, por ejemplo, Biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); NBC biorreactor (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores a escala de laboratorio y comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Con respecto al volumen de cultivo, en el contexto de la presente invención, es importante que lo cultivos se mantengan a una temperatura inferior o igual a 35°C, para asegurar la recuperación eficaz del virus de la gripe recombinante o de genoma reordenado usando el sistema multiplásmido descrito en el presente documento. Por ejemplo, se cultivan las células a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 35°C, normalmente a una temperatura entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, usualmente a aproximadamente 33°C.

Normalmente, se emplea un regulador, por ejemplo, un termostato u otro dispositivo para percibir y mantener la temperatura de los sistemas de cultivos celulares para asegurar que la temperatura no exceda de 35°C durante el periodo de replicación del virus.

Introducción de vectores en células huéspedes

Se introducen vectores que comprenden segmentos genómicos de la gripe (por ejemplo, transfectados) en las células Vero de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, precipitación simultánea con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. Se pueden transfectar por ejemplo, vectores, por ejemplo, plásmidos, en las células huéspedes, tales como células COS, células 293T o combinaciones de células COS o 293T y células MDCK, usando el reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con la instrucciones del fabricante. Se va a introducir aproximadamente 1 μ g de cada vector en la población de células huéspedes con aproximadamente 2 μ l de TransIT-LT1 diluido en 160 μ l de medio, preferiblemente medio libre de suero, en un vol. total de 200 μ l. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incuban a temperatura ambiente durante 45 min seguido por la adición de 800 μ l de medio. Se añade la mezcla de transfección a las células huéspedes, y se cultivan las células tal como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con esto, para la producción de virus recombinantes o de genoma reordenado en un cultivo celular, se mezclan los vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos del genoma (PB2, PB1, PA, NP, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 μ l de TransIT-LT1 y se transfectan en las células huéspedes. Opcionalmente, se sustituye el medio que contiene suero antes de la transfección con medio libre de suero, por ejemplo, Opti-MEM I, y se incuban durante 4-6 horas.

Alternativamente, se puede emplear la electroporación para introducir vectores que incorporan segmentos del genoma de la gripe en células huéspedes. Por ejemplo, se introducen favorablemente vectores que incorporan virus de la gripe A o de la gripe B en células Vero usando la electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. De manera breve, 5x10⁶ células Vero que crecen en Medio Eagle Modificado (MEM) suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (FBS) se vuelven a suspender en 0,4 ml de OptiMEM y se colocan en una cubeta de electroporación.

Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 μ l a las células en la cubeta, que se mezclan a continuación suavemente mediante golpecitos. Se lleva a cabo la electroporación de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, BioRad Gene Pulser II con Capacitance Extender Plus conectado) a 3000 voltios, 950 microfaradios con una constante de tiempo de entre 28-33 ms. Se vuelven a mezclar las células suavemente mediante golpecitos y aproximadamente 1-2 minutos después de la electroporación, se añaden 0,7 ml de MEM con FBS al 10% directamente a la cubeta. A continuación se transfieren las células a dos pocillos de una placa normalizada de cultivo de tejido de 6 pocillos y la suspensión lavada se divide entre los dos pocillos. El volumen final es aproximadamente de 3,5 ml. A continuación se incuban las células en condiciones adecuadas para el crecimiento vírico, por ejemplo, a aproximadamente 33°C para las cepas adaptadas al frío.

Recuperación de virus

Los virus se recuperan normalmente del medio de cultivo, en el cual se han hecho crecer las células infectadas (transfectadas). Normalmente, el medio bruto se clarifica antes de la concentración de los virus de la gripe. Los procedimientos comunes incluyen la filtración, ultrafiltración, adsorción con sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, el medio bruto de los cultivos infectados se puede clarificar en primer lugar mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para eliminar los desechos celulares y otra gran materia particulada, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Alternativamente, se filtra el medio a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8 μ m para eliminar las células intactas y otra gran materia particulada. Opcionalmente, se centrifuga a continuación el sobrenadante del medio clarificado para aglomerar de virus de la gripe, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Tras la resuspensión del aglomerado de virus en un tampón apropiado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o solución salina tamponada con fosfato (PBH) a pH 7,4, se concentra el virus mediante centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa (60%-12%) o tartrato de potasio (50%-10%). Es adecuado un gradiente continuo o por etapas, por ejemplo, un gradiente de sacarosa entre 12% y 60% en cuatro etapas al 12%. Se centrifugan los gradientes a una velocidad, y durante un tiempo, suficientes para concentrar los virus en una banda visible para la recuperación. Alternativamente, y para aplicaciones comerciales a escala más grande, se elutía el virus a partir de los gradientes de densidad usando una centrífuga rotatoria zonal que opera en modo continuo. Se proporcionan detalles adicionales para guiar a una persona experta en la preparación de los virus de la gripe a partir de cultivos de tejidos, por ejemplo, en Furminger. Vaccine Production, en Nicholson y col. (eds) Textbook of Influenza pp. 324-332; Merten y col (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen y Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccine spp. 141-151, y en la patente de los Estados Unidos n° 5.690.937. Si se desea, se pueden Almacenar los virus recuperados a -80°C en presencia de sacarasa-fosfato-glutamato (SPG) como estabilizante.

Procedimientos y composiciones para la administración profiláctica de vacunas

Se pueden administrar profilácticamente los virus de genoma reordenado producidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento en un vehículo o excipiente apropiado para estimular una respuesta inmune específica para una o más cepas del virus de la gripe. Normalmente, el vehículo o excipiente es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución salina acuosa, soluciones salinas tamponadas acuosas, soluciones acuosas de dextrosa, soluciones acuosas de glicerol, etanol, fluido alantoico procedente de huevos de gallina sin infectar (es decir, fluido alantoico normal "NAF") o sus combinaciones. La preparación de dichas soluciones asegurando la esterilidad, el pH, la isotonicidad, y la estabilidad, se efectúa de acuerdo con los protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un vehículo o excipiente para minimizar los efectos alérgicos y otros indeseables, y para seguir la ruta particular de administración, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

Generalmente, se pueden administrar virus de la gripe en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmune específica para una o más cepas del virus de la gripe. Preferiblemente, la administración de los virus de la gripe estimula una respuesta inmune protectora. Las personas expertas en la técnica conocen las dosificaciones y los procedimientos para estimular una respuesta inmune protectora frente a una o más cepas de la gripe. Se proporcionan, por ejemplo, virus inactivados en el intervalo de aproximadamente 1-1000 de la DIH₅₀ (dosis infecciosa humana), es decir, aproximadamente 10⁵-10⁸ ufp (unidades formadoras de placas) por dosis administrada. Alternativamente, se administran aproximadamente 10-50 μ g, por ejemplo, aproximadamente 15 μ g de HA sin un adyuvante, administrándose dosis más pequeñas con un adyuvante. Normalmente, se ajustará la dosis dentro de este intervalo basándose en, por ejemplo, la edad, la condición física, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y una jeringuilla, o un dispositivo de inyección sin aguja. Alternativamente, la formulación de vacuna se administrar intranasalmente, tanto en gotas, grandes partículas en aerosol (mayores de aproximadamente 10 micrómetros), como mediante pulverización en el tracto respiratorio superior. Aunque cualquiera de las anteriores rutas de administración da como resultado una respuesta inmune sistémica protectora, la administración intranasal confiere los beneficios añadidos de estimular la inmunidad mucosal en el punto de entrada del virus de la gripe. Para la administración intranasal, se prefieren a menudo vacunas de virus vivo atenuado, por ejemplo, un virus de la gripe recombinante o de genoma reordenado atenuado, adaptado al frío y/o sensible a la temperatura. Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmune protectora con una única dosis, se pueden administrar dosificaciones adicionales, mediante la misma o diferente ruta, para conseguir el efecto profiláctico deseado.

Alternativamente, se puede estimular una respuesta inmune dirigiendo *ex vivo* células dendríticas con virus de la gripe. Se exponen, por ejemplo, células dendríticas proliferantes a los virus en una cantidad suficiente y durante un

periodo de tiempo suficiente para permitir capturar los antígenos de la gripe en las células dendríticas. A continuación se transfieren las células a un sujeto que se va a vacunar mediante procedimientos normalizados de trasplante intravenoso.

Opcionalmente, la formulación para la administración profiláctica de los virus de la gripe, o de sus subunidades, contiene también uno o más adyuvantes para potenciar la respuesta inmune a los antígenos de la gripe. Los adyuvantes adecuados incluyen: saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum*, y los adyuvantes sintéticos QS-21 y MF59.

Si se desea, se puede llevar a cabo la administración de vacunas profilácticas de los virus de la gripe en conjunción con la administración de una o más moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras, y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulador de colonias (FSC) de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Fit3, B7.1; B7.2, etc. Se pueden administrar las moléculas inmunoestimuladoras en la misma formulación que los virus de la gripe, o se pueden administrar separadamente. Se pueden administrar tanto la proteína como un vector de expresión que codifica la proteína, para producir un efecto inmunoestimulador.

En otra forma de realización se pueden emplear los vectores para uso en los procedimientos proporcionados por esta invención que incluyen segmentos del genoma de la gripe para introducir ácidos nucleicos heterólogos en un organismo huésped o célula huésped, tales como células de mamíferos, células derivadas de un sujeto humano, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente adecuado tal como se ha descrito anteriormente. Normalmente, se inserta el ácido nucleico heterólogo en una región no esencial de un gen o segmento génico, por ejemplo, el gen M del segmento 7. La secuencia heteróloga de polinucleótidos puede codificar un polipéptido o péptido, o un ARN, tal como un ARN de sentido contrario o ribozima. A continuación se introduce el ácido nucleico heterólogo en un huésped o células huéspedes produciendo virus recombinantes que incorporan el ácido nucleico heterólogo, y se administran los virus tal como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, se puede introducir un vector para uso en esta invención que incluye un ácido nucleico heterólogo y expresarse en células huéspedes transfectando simultáneamente el vector en una célula infectada con un virus de la gripe. Opcionalmente, se devuelven o administran las células a continuación al sujeto, normalmente en el punto desde el cual se obtuvieron. En alguna aplicación, se injertan las células sobre un tejido, órgano, o punto del sistema (tal como se ha descrito anteriormente) de interés, usando los procedimientos de transferencia o injerto de células establecidos. Por ejemplo, se pueden administrar a un sujeto citoblastos de linaje hematopoyético, tales como de médula ósea, cordón umbilical o sangre periférica derivados de citoblastos hematopoyéticos usando técnicas normalizadas de administración o transfusión.

Alternativamente, se pueden administrar los virus que comprenden un ácido nucleico heterólogo a las células de un sujeto *in vivo*. Normalmente, dichos procedimientos implican la administración de partículas de vector a una población de células diana (por ejemplo, célula de la sangre, células de la piel, células del hígado, células neurales (que incluyen las del cerebro), células de riñón, células uterinas, células musculares, células intestinales, células cervicales, células vaginales, células prostáticas, etc, así como células tumorales derivadas de una variedad de células, tejido y/u órganos. La administración puede ser tanto sistémica, por ejemplo, mediante la administración intravenosa de partículas víricas, como administrando directamente las partículas víricas en un punto o puntos de interés mediante una variedad de procedimientos, que incluyen la inyección (usando, por ejemplo, una aguja o jeringuilla), la administración de vacuna sin aguja, la administración tópica, o mediante impulso en un tejido, órgano o punto de la piel. Se pueden administrar, por ejemplo, las partículas del vector vírico mediante administración por inhalación, oral, intravenosa, subcutánea, subdérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, vaginal o rectal, o colocando las partículas víricas en el interior de una cavidad u otro punto del cuerpo, por ejemplo, durante la cirugía.

Los procedimientos anteriormente descritos son útiles para producir virus que se pueden usar para tratar terapéutica y/o profilácticamente una enfermedad o trastorno introduciendo un vector de la invención que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido (o péptido) terapéutica o profilácticamente efectivo o ARN (por ejemplo, un ARN de sentido contrario o ribozima) en una población de células diana *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Normalmente, el polinucleótido que codifica el polipéptido (o el péptido), o el ARN de interés, se une de manera operable a las secuencias reguladoras apropiadas tal como se ha descrito anteriormente en las secciones tituladas “Vectores de Expresión” y “Elementos Adicionales de la Expresión”. Opcionalmente, se incorpora más de una secuencia heteróloga de codificación en un vector o virus único. Por ejemplo, adicionalmente a un polinucleótido que codifica un polipéptido o ARN terapéutica o profilácticamente activo, el vector puede incluir también polipéptidos terapéuticos o profilácticos adicionales, por ejemplo, antígenos, moléculas coestimuladoras, citocinas, anticuerpos, etc, y/o marcadores, y similares.

Se pueden usar los procedimientos de la presente invención para generar virus para el uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una amplia variedad de trastornos, que incluyen trastornos genéticos y adquiridos, por ejemplo, como vacunas para enfermedades infecciosas, debidas a virus, bacterias, y similares.

Kits

Para facilitar el uso de vectores y sistemas de vectores de la invención, cualquiera de los vectores, por ejemplo, los plásmidos consenso del virus de la gripe, plásmidos variantes de los polipéptidos de la gripe, plásmidos de una biblioteca de polipéptidos de la gripe, etc, y componentes adicionales, tales como, tampón, células, medio de cultivo, útiles para el empaquetado y la infección de virus de la gripe a objeto experimental o terapéutico, se pueden empaquetar en forma de un kit. Normalmente, el kit contiene, adicionalmente a las anteriores composiciones, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para llevar a cabo lo procedimientos de la invención, material empaquetado, y un contenedor.

Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas víricas

En el contexto de la invención, los ácidos nucleicos y/o las proteínas del virus de la gripe se manipulan de acuerdo con técnicas bien conocidas de biología molecular. Se describen protocolos detallados para numerosos de dichos procedimientos, que incluyen la amplificación, la clonación, la mutagénesis, la transformación, y similares, en, por ejemplo Ausebel y col. Current Protocols in Molecular Biology (con suplemento en 2000) John Wiley & Sons, Nueva York ("Ausebel"; Sambrook y col. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook"), y Berger y Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzimology volume 152 Academic press, Inc., San Diego, CA ("Berger").

Adicionalmente a las anteriores referencias, se encuentran protocolos para técnicas de amplificación *in vitro*, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación mediante la Q β -replicasa, y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), útiles, por ejemplo, para amplificar sondas de ADN de la invención en Mullis y col (1987) Patente de los Estados Unidos nº 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods an Applications (Innis y col. Eds) Academic Press Inc. San Diego CA (1990) ("Innis"); Arnheim y Levison (1990) C&EN 36; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81; Kwoh y col (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86, 1173; Guatelli y col. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87: 1874, Lomell y col. (1989) J Clin Chem 35: 1826; Landegren y col. (1988) Science 241: 1077; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560; Barringer y col. (1990) Gene 89: 117, y Sooknanan y Malak (1995) Biotechnology 13: 563. Los Procedimientos adicionales, útiles para clonar ácidos nucleicos en el contexto de la presente invención, incluyen Wallace y col, Patente de los Estados Unidos Nº 5.426.039. Se resumen procedimientos mejorados para amplificar grandes ácidos nucleicos mediante la PCR en Cheng y col. (1994) Nature 369: 684 y en las referencias de lo anterior.

Se pueden sintetizar algunos polinucleótidos de la invención, por ejemplo, oligonucleótidos utilizando diversas estrategias en fase sólida que incluye la química de acoplamiento de la fosforamidita basada en mononucleótidos y/o trinucleótidos. Se pueden sintetizar, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos mediante la adición secuencial de monómeros y/o trómeros activados para alargar una cadena de polinucleótidos. Véase, por ejemplo, Caruthers, M.H. y col. (1992) Meth Enzymol 211:3.

En lugar de sintetizar las secuencias deseadas, se puede ordenar esencialmente de manera aleatoria cualquier ácido nucleico a partir de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (mrcr@oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), Expressgen, Inc (www.expressgen.com), Operon Technologies, Inc (www.operon.com), y otras muchas.

Adicionalmente, se pueden llevar a cabo sustituciones de restos aminoácidos seleccionados en polipéptidos víricos mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al emplazamiento. Se pueden producir, por ejemplo, polipéptidos víricos con sustituciones de aminoácidos funcionalmente correlacionados con características fenotípicas deseables, por ejemplo, un fenotipo atenuado, adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, introduciendo mutaciones específicas en un segmento de ácido nucleico vírico que codifica el polipéptido. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para la mutagénesis dirigida al emplazamiento, y se describen, por ejemplo, en Ausebel, Sambrook, y Berger, más arriba. Están comercialmente disponibles numerosos kits para llevar a cabo la mutagénesis dirigida al emplazamiento, por ejemplo, el Kit de Mutagénesis Dirigida al Emplazamiento Chamaleon (Stratagene, La Jolla), y se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante para introducir, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos descritas en la Tabla 6 o en la Tabla 17, en un segmento de genoma que codifica un polipéptido de la gripe A o B, respectivamente.

Ejemplos**Ejemplo 1***Construcción de pAD3000*

Se modificó el plásmido pHW2000 (Hoffmann y col. (2000) ADNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97: 6108-6113) para sustituir las señales de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) por las secuencias de la señal de poliadenilación derivadas del virus 40 de simios (SV40).

ES 2 345 492 T3

Se amplificaron las secuencias derivadas de SV40 con Taq MasterMix (Qiagen) usando los siguientes oligonucleótidos, designados en la dirección 5' a 3':

poliA.1: AACAAATTGAGATCTCGGTCACCTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT (SEC DE ID N°: 1)

poliA.2: TATAACTGCAGACTAGTGATATCCTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTA (SEC DE ID N°: 2)

Se usó el plásmido pSV2His como plantilla. Se obtuvo un fragmento consistente con el producto predicho de 175 pb y se clonó en pCDNA3, usando un vector de clonación Topo TA (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El fragmento deseado de 138 pb que contenía las señales de poliadenilación de SV40 se escindió a partir del plásmido resultante con EcoRV y BstEII, aislado de un gel de agarosa, y se unió entre los únicos emplazamientos PvuII y BstEII en pHW2000 usando técnicas convencionales (véanse, por ejemplo, Ausebel, Berger, Sambrook). Se secuenció el plásmido resultante, pAD3000 (Figura 1), y se encontró que contenía el emplazamiento de poliadenilación de SV40 en la orientación correcta. Los nucleótidos 295-423 en pAD3000 corresponden a los nucleótidos 2466-2594, respectivamente, en la cepa 777 de SV40 (AF332562).

Ejemplo 2

Sistema de ocho plásmidos para la producción de MDV-A

Se ha usado comúnmente una variante de la cepa A/AA/6/69 de tipo A del virus de la gripe adaptada al frío como virus donante maestro para la producción de vacunas de la gripe A administradas nasalmente. Esta cepa es un Virus Donante Maestro (MDV) a modo de ejemplo en el contexto de la presente invención. Por simplicidad, esta variante de la cepa A/AA/6/60 se designa en el presente documento MDV-A. Se extrajo el ARN vírico de MDV-A usando el mini kit RNeasy (Qiagen) y se amplificaron los ocho fragmentos de ADNc correspondientes mediante la PCR-RT usando los cebadores relacionados en la Tabla 1.

TABLA 1

Secuencias de los cebadores usados para la clonación de los ocho segmentos de MDV-A

SEC DE ID	Cebador	Secuencia (5'-3')
CEBADORES DIRECTOS DE MDV-A		
SEC DE ID N°: 3	AarI PB2 largo	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC GAA AGC AGG TC
SEC DE ID N°: 4	BsmBI-PB1	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC AAA
SEC DE ID N°: 5	BsmBI-PA	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT ACT
SEC DE ID N°: 6	BsmBI-NP	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TAG A
SEC DE ID N°: 7	AarI HA-largo	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC AAA AGC AGG GG
SEC DE ID N°: 8	BsmBI-NA	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGA GTG A
SEC DE ID N°: 9	BsmI-M	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGT AGA T
SEC DE ID N°: 10	BsmBI-NS	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TGA
CEBADORES INVERSOS DE MDV-A		
SEC DE ID N°: 11	AarI PB2-largo	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGT CGT TT
SEC DE ID N°: 12	BsmBI-PB1	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
SEC DE ID N°: 13	BsmBI-PA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
SEC DE ID N°: 14	BsmI-NP	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT
SEC DE ID N°: 15	AarI HA-largo	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGG TGT T

ES 2 345 492 T3

TABLA 1 (continuación)

SEC DE ID	Cebador	Secuencia (5'-3')
SEC DE ID N°: 16	BsmBI-NA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAG TTT
SEC DE ID N°: 17	BsmBI-M	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAT GTT
SEC DE ID N°: 18	BsmBI-NS	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT

Con la excepción de los segmentos del genoma de la gripe que codifican HA y PB2, que se amplificaron usando los cebadores que contienen el emplazamiento de reconocimiento del enzima de restricción Aar I, se amplificaron los 6 genes restantes con cebadores que contenían el emplazamiento de reconocimiento del enzima de restricción BsmB I. Se clonaron ambos fragmentos del ADNc de AarI y BsmB I entre los dos emplazamientos BsmB I del vector pAD3000.

El análisis de secuenciación desveló que todos los fragmentos de ADNc clonados contenían mutaciones con respecto con respecto a la secuencia MDV-A consenso, que se introdujeron igualmente durante las etapas de clonación. En la Tabla 2, se resumen las mutaciones encontradas en cada gen.

TABLA 2

Mutaciones introducidas en los clones de MDV-A en pAD3000

Segmentos génicos	Posiciones de la mutación (nt)	Cambios de aminoácidos
PB2	A954(G/C/T), G1066A, T1580C, T1821C	Silencioso, Gly por Ser, Val por Ala, Silencioso
PB1	C1117T	Arg para detener
PA	G741A, A1163G, A1615G, T1748C, C2229del	Gly por Ser, Asp por Gly, Arg por Gly, Met por Thr, sin codificar
HA	A902C, C1493T	Asn por His, Cys por Arg
NP	C113A, T1008C	Thr por Asn, silencioso
NA	C1422T	Pro por Leu
M	A191G	Thr por Ala
NS	C38T	Silencioso

Todas las mutaciones se volvieron a corregir para la secuencia consenso de MDV-A usando un Kit de Mutagénesis Dirigida al Emplazamiento QuikChange (Stratagene) y los cebadores de oligonucleótidos sintéticos que se muestran en la Tabla 3.

ES 2 345 492 T3

TABLA 3

Cebadores usados para corregir las mutaciones en los clones de MDV-A

	HJ67	PB2A954G	5/P/gcaagctgtggaaatatgcaaggc (SEC DE ID N°:19)
	HJ68	PB2A954G.as	gccttgcatattccacagctgc (SEC DE ID N°: 20)
	HJ69	PB2G1066A	5/P/gaagtgttacgggcaatctcaaac (SEC DE ID N°: 21)
PB2	HJ70	PB2G1066A.as	gttgaagattgcccgaagcacttc (SEC DE ID N°: 22)
	HJ71	PB2T1580A	5/P/cctgaggaggtcagtgaacac (SEC DE ID N°: 23)
	HJ72	PB2T1580A.as	gtgttcactgacctcctcagg (SEC DE ID N°: 24)
	HJ73	PB21821C	5/P/gttgttaggactctattccaac (SEC DE ID N°: 25)
	HJ74	PB21821C.as	gttgaatagagtcctaacaac (SEC DE ID N°: 26)
PB1	HJ75	PB1C1117T	gacagtaagctccgaacacaatac (SEC DE ID N°: 27)
	HJ76	PB1C1117T.as	gtattgtgtcgagctcatgc (SEC DE ID N°: 28)
	HJ77	PA-G742A	5/P/cgaaccgaacggctacattgaggg (SEC DE ID N°: 29)
	HJ78	PA-G742A.as	ccctcaatgtagccgttcggttcg (SEC DE ID N°: 30)
	HJ79	PA-A1163G	5/P/cagagaaggtagattgacgactg (SEC DE ID N°: 31)
	HJ80	PA-A1163G.as	cagtcgcaaagctaccttctctg (SEC DE ID N°: 32)
PA	HJ81	PA-A1615G	5/P/cactgacccaagactgagccac (SEC DE ID N°: 33)
	HJ82	PA-A1615G.as	gtggctcaagtcttgggtcagtg (SEC DE ID N°: 34)
	HJ83	PA-T1748C	5/P/caaagattaaaatgaaatggggaatg (SEC DE ID N°: 35)
	HJ84	PA-T1748C.as	cattccccatttcatttaattcttg (SEC DE ID N°: 36)
	HJ85	PA-C2229	5/P/gtacctgtttctactaataaccccg (SEC DE ID N°: 37)
	HJ86	PA-C2230.as	ccgggttattagtagaacaaggtac (SEC DE ID N°: 38)
	HJ87	HA-A902C	5/P/ggaacacttgagaactgtgagacc (SEC DE ID N°: 39)
HA	HJ88	HA-A902C.as	gggtacagttctaagtgttc (SEC DE ID N°: 40)
	HJ89	HA-C1493T	5/P/gaattttatcacaaatgtgatgaatg (SEC DE ID N°: 41)
	HJ90	HA-C1493T.as	cattcatcatcacatttgtataaaattc (SEC DE ID N°: 42)
	HJ91	NP-C113A	5/P/gccagaatgcaactgaaatcagagc (SEC DE ID N°: 43)
NP	HJ92	NP-C113A.as	gctctgatttcagttcattctggc (SEC DE ID N°: 44)
	HJ93	NP-T1008C	5/P/ccgaatgagaatccagcacacaag (SEC DE ID N°: 45)
	HJ94	NP-T1008C.as	cttgtgtgctggattctattcgg (SEC DE ID N°: 46)
	HJ95	NA-C1422T	catcaatttcagcttatataagcttc (SEC DE ID N°: 47)
NS	HJ96	NA-C1422T.as	gaaagcttatataggcatgaaattgatg (SEC DE ID N°: 48)
	HJ97	NS-C38T	cataatggatcctaactgtgtcaaagc (SEC DE ID N°: 49)
	HJ98	NS-C38T.as	gcttgacacagtgtaggatccattatg (SEC DE ID N°: 50)

TABLA 3 (continuación)

PA	HJ99	PA6C375T	ggagaatagattcatcgagattggag (SEC DE ID N°: 51)
	HJ100	PA6C375T.as	ctccaatctcgatgaatctattctcc (SEC DE ID N°: 52)

Ejemplo 3

Generación de MDV-A recombinante infeccioso y virus de la gripe de genoma reordenado

Se mantuvieron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células COS7 humanas en Medio Eagle modificado (MEM) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS). Se mantuvieron células de riñón embrionario humano (293T) en Opti-MEM I (Life Technologies) que contenía FBS al 5%. Se cultivaron simultáneamente las células MDCK y cualquiera de COS/ o 293T en placas de 6 pocillos a una relación de 1:1 y se usaron las células para la transfección a una confluencia de aproximadamente el 80%. Las células 293T y COS7 tienen una elevada eficacia de transfección, pero no son permisivas para la replicación del virus de la gripe. El cultivo simultáneo con células MDCK asegura una replicación eficaz de los virus recombinantes. Antes de la transfección, se sustituyeron los medios que contenían suero con medio libre de suero (Opti-MEM I) y se incubaron durante 4-6 horas. Se llevó a cabo la transfección del ADN plásmido usando TansIT-LT1 (Mirus) mezclando 1 µg de cada uno de los 8 ADN plásmidos (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con 20 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de Opti-MEM en un volumen total de 200 µl. Se incubaron las mezclas de ADN: reactivo de transfección a temperatura ambiente durante 45 min seguido por la adición de 800 µl de Opti-MEM I. A continuación se añadió la mezcla de transfección a las células MDCK/293T o MDCK/COS/cultivadas simultáneamente. Se incubaron las células transfectadas a 35°C o 33°C durante entre 6 horas y 24 horas, por ejemplo, durante la noche, y se sustituyó la mezcla de transfección con 1 ml de OPTI-MEM I en cada pocillo. Tras incubación a 35°C o 33°C durante 24 horas, se añadió 1 ml de Opti-MEM I que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina a cada pocillo y se incubó durante 12 horas más. A continuación se amplificó el virus recuperado en células MDCK confluentes o se amplificó directamente en huevos con embriones de pollo. Se infectaron células MDCK en placas de 12 pocillos con 0,2 ml de la mezcla de transfección durante 1 hora a temperatura ambiente, a continuación se retiró la mezcla y se sustituyó con 2 ml de Opti-MEM I que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina. Se incubaron las células a 35°C o 33°C durante 3-4 días. Se almacenaron los virus amplificados a -80°C en presencia estabilizador de SPG o se purificaron en placa y se amplificaron en células MDCK o huevos con embrión de pollo.

Expresión funcional de proteínas polimerasas de MDV-A

Se analizó la actividad funcional de las cuatro proteínas polimerasas de MDV-A, PB2, PB1, PA y NP, por su capacidad para replicarse en el minigenoma de un virus de la gripe que codifica un gen indicador EGFP. Un conjunto de 8 plásmidos de expresión (véase, por ejemplo, la Tabla 4) (Hoffmann y col. (2001) Eight plasmid rescue system for influenza A virus; Options for the control of influenza International Congress Series 1219: 1007-1013) que contenían los ADNs de la cepa A/PR/8/34 (H1N1) y el minigenoma de un virus de la gripe que contenía un gen indicador que codificaba la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP, pHW72-EGFP).

Se transfectaron PB1, PB2, PA y NP o PB1, PA, NP de MDV-A (-PB2 como control negativo) en células MDCK/293T cultivadas simultáneamente junto con un plásmido que representaba el minigenoma EGFP de un virus de la gripe A (PHW72-EGFP) (Hofmann y col. (2000) "Ambisense approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA Synthesis from one template Virology" 15: 267(2), 310-7). Se observaron las células transfectadas con microscopio de control de fases o microscopio de fluorescencia a las 48 horas después de la transfección. Alternativamente, se puede emplear citometría de flujo para detectar la expresión de EGFP.

Tal como se muestra en la Figura 2, se observó fluorescencia verde, indicando la expresión del minigenoma EGFP en las células transfectadas con PB2, PB1, PA y NP de MDV-A, pero no en las células transfectadas únicamente con tres proteínas polimerasas. Esto indicó que las proteínas polimerasas de MDV-A eran funcionales en pAD3000.

En otros ensayos, se utilizó un minigenoma que incluye el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), designado pFluCAT para medir la actividad de la polimerasa. En dicho ensayo, se midió la expresión de CAT en la proteína (por ejemplo, mediante ELISA) o el nivel de ARN, como un indicador de la replicación del minigenoma.

Análisis de los plásmidos de MDV-A mediante experimento de reordenación de genoma de gen único

Se demostró que cada uno de los 8 segmentos del genoma de MDV-A clonados en pAD3000 se expresaba funcionalmente en un experimento de reordenación de genoma transfectando simultáneamente un segmento de gen único procedente de MDA-A junto con los siete segmentos complementarios procedentes de la cepa control A/PR/8/34.

ES 2 345 492 T3

Los Ocho plásmidos del segmento del genoma único en combinación con los segmentos control complementarios generaron virus de genoma reordenado infeccioso, que produjo efectos citopáticos en las células MDCK infectadas, indicando que los ocho plásmidos codifican proteínas MDV-A funcionales. Tabla 4.

TABLA 4

Recuperación de genomas reordenados 7+1 mediante plásmidos

Segmento génico del virus	PB2	PB1	PA	NP
1	PMDV-A-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	PHW192-PB1	pMDV-A-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	PHW193-PA	pHW193-PA	pMDV-A-PA	pHW193-PA
4	PHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	pMDV-A-NP
5	PHW197-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	PHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	PHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA
8	PHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)
Segmento génico del virus	M	NS	HA	NA
1	PHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	PHW192-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	PHW193-PA	pHW193-PA	pHW193-PA	pHW193-PA
4	PHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP
Segmento génico del virus	M	NS	HA	NA
5	PMDV-A-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	PHW198-NS	pMDV-A-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	PHW194-HA	pHW194-HA	pMDV-A-HA	pHW194-HA
8	PHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pMDV-A-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)

Para determinar adicionalmente las restricciones de empaquetado del virus de la gripe A, se separó el segmento NS en dos segmentos génicos separados; uno que codificaba el segmento genómico NS1 y el otro que codificaba el segmento genómico NS2. Se transfectaron los nueve plásmidos que incorporaban los segmentos genómicos de la gripe A en células MDCK/COS tal como se ha descrito anteriormente, y se amplificaron los virus recuperados en huevos con embrión de pollo antes de la valoración en células MDCK. Se observó reducido tamaño de placa para el sistema de nueve plásmidos en comparación con el sistema de ocho plásmidos descrito anteriormente. El análisis de la PCR-RT demostró que únicamente estaba presente el segmento NS2 en los viriones, y que el segmento génico NS1 no estaba empaquetado.

Recuperación de MDV-A y virus de genoma reordenado 6:2

Tras los procedimientos descritos anteriormente, tres días después de la transfección con cualquiera de los 8 plásmidos de MDV-A (recombinante), o con los plásmidos que incorporaban los 6 genes internos de MDV-A, y HA y NA derivados de A/PR/8/34 (genoma reordenado 6:2), se usaron los sobrenadantes de los cultivos para infectar células MDCK recientes, y se incubaron las células infectadas a 33°C durante tres días en presencia de 1 µg/ml de TPCK-tripsina. Se observó el efecto citoplásmico del virus recombinante sobre las células MDCK infectadas usando un microscopio. Se vigiló la expresión de la hemaglutinina vírica usando un ensayo de hemaglutinación normalizado (HA). Se llevaron a cabo los ensayos de HA mezclando 50 µl de sobrenadantes de cultivo diluidos en serie dos veces con 50 µl de glóbulos rojos de pollo al 1% en placas de 96 pocillos. Se detectó un título de HA de aproximadamente 1:254-1:1024 para los virus amplificados derivados de cualquiera de los 8 plásmidos de MDV-A transfectados, o de los virus de genoma reordenado 6:2. Se usó la reacción de transfección utilizando los 8 plásmidos de A/PR/8/34 obtenidos del

ES 2 345 492 T3

Dr. E. Hoffman como control positivo. Se produjeron virus de la gripe infecciosos procedentes de estas tres reacciones de transfección tal como se indica en la Tabla 5.

TABLA 5

Plásmidos usados para la recuperación de A/PR/8/34, MDV-A y genoma reordenado 6:2

Segmento génico del virus	A/PR/8/34 (H1N1)	rMDV-A (H2N2)	Genoma reordenado 6:2
1	pHW191-PB2 (AD731)	pMDV-A-PB2nº2 (AD760)	pMDV-A-PB2nº2 (AD760)
2	pHW192-PB1 (AD732)	pMDV-A-PB1 (AD754)	pMDV-A-PB1 (AD754)
3	pHW193-PA (AD733)	pMDV-A-PA (AD755)	pMDV-A-PA (AD755)
4	pHW195-NP (AD735)	pMDV-A-NPnº1 (AD757)	pMDV-A-NPnº1 (AD757)
5	pHW197-M (A737)	pMDV-A-M (AD752)	pMDV-A-M (AD752)
6	pHW198-NS (AD738)	pMDV-A-NS (AD750)	pMDV-A-NS (AD750)
7	pHW194-HA (AD734)	pMDV-A-HA (AD756)	pHW194-HA (AD734)
8	pHW-196-NA (AD735)	pMDV-A-NA nº4 (AD759)	pHW196-NA (AD736)
CPE	+	+	+

Se llevó a cabo la PCR-RT para mapear los genotipos de los virus recuperados. Se aisló el ARN vírico a partir del sobrenadante del cultivo celular infectado usando el mini Kit RNeasy (Qiagen) y se amplificaron los ocho segmentos del virus de la gripe mediante la PCR-RT usando cebadores específicos para cada uno de los segmentos génicos de MDV-A y cebadores específicos de H1 y N1. Tal como se muestra en la Figura 3, rMDV-A contenía PB2, PB1, NP, PA, M y NS que eran específicos de MDV-A y HA y NA específicos del subtipo H2 y N2. El genoma reordenado 6:2 contenía los 6 genes internos derivados de MDV-A, y HA y NA derivados de A/PE/8/34 (H1N1). Esto confirmó que los virus generados a partir de los plásmidos transfectados tenían los genotipos correctos.

Se valoraron los virus rescatados mediante ensayo de placas en células MDCK y se confirmó que las placas eran de virus de la gripe mediante inmunotinción usando suero de pollo desarrollado contra MDV-A. Se infectaron células MDCK a una confluencia del 100% en placas de 12 pocillos con 100 µl de virus diluido en serie 10 veces a RT durante 1 h con agitación suave. Se retiró el inóculo y se cubrieron las células con 1XL15 que contenía agarosa al 0,8% y 1 µg/ml de TPCK-tripsina. Se incubaron las placas a 35°C o 33°C durante tres días, se fijaron con metanol al 100%, se bloquearon en leche al 5% en PBS, y se incubaron con antisuero de MDV-A dirigido contra pollo diluido 1:2000 durante 1 hora seguido por incubación con IgG de pollo dirigida contra conejo conjugada con HRP durante 1 h. se visualizaron las placas mediante la adición de solución sustrato de HRP (DAKO). Todos los virus recuperados presentaron inmunotinción positiva.

Ejemplo 4

Mapeo de la base genética de los fenotipos ca; ts; att de MDV-A

La cepa MDV-A de la vacuna del virus de la gripe tiene diversos fenotipos relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, vacunas atenuadas vivas: adaptación al frío (ca), sensibilidad a la temperatura (ts) y atenuación (att). La comparación de las secuencias de la cepa MDV-A con la cepa A/AA/6/60 natural virulenta sin ts desveló que había un mínimo de 17 diferencias entre estas dos cepas (Tabla 6). Algunos de los cambios en la secuencia de MDV-A son únicos para esta cepa en comparación con todos los virus de tipo A de la gripe disponibles en la base de datos del GeneBank, sugiriendo que una o más de estas sustituciones de aminoácidos están funcionalmente relacionadas con el fenotipo(s) att, ca y ts. El único cambio de aminoácidos en PB2821 fue solo en la posición del nucleótido que se había informado anteriormente como determinante en el fenotipo ts de MDV-A (Subbarao y col. (1995) Addition of Temperature-Sensitive Missense Mutations into the PB2 Gene of Influenza A Transfectant Viruses Can Effect an Increase in Temperature Sensitivity and Attenuation and Permits the National Design of a Genetically Engineered Live Influenza A Virus Vaccine J. Virol. 69. 5969-5977).

Con el fin de identificar las sustituciones mínimas implicadas en los fenotipos de MDV-A, los nucleótidos en el clon de MDVA que diferían de A/A/6/60 natural se cambiaron individualmente por los de A/AA/6/60 natural (es decir, "invertido"). A continuación se introdujo cada segmento génico invertido en células huéspedes en combinación con segmentos complementarios de MDV-A para recuperar los genomas reordenados de gen único. Adicionalmente, se

ES 2 345 492 T3

pueden transfectar también el segmento génico invertido y el segmento de MDV-A correspondiente en combinación con los segmentos derivados de otras cepa naturales, por ejemplo, la cepa A/PR/8/34, para evaluar la contribución de cada segmento génico a los fenotipos del virus. Usando el sistema plásmido de MDV-A recombinante descrito anteriormente, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al emplazamiento para modificar adicionalmente los seis genes internos para producir un genoma reordenado sin ts. Se introdujeron un total de 15 mutaciones con sustituciones de nucleótidos en los seis plásmidos de MDV-A para representar el genoma de A/AA/6/60 natural recombinante (rWt, Flu064) tal como se relaciona en la Tabla 6, se mantuvieron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células COS7 y se transfectaron tal como se ha descrito anteriormente: A continuación se pasó el virus recuperado una vez en células MDCK, seguido por amplificación en las cavidades alantoicas de huevos con embrión de pollo. Se llevó la transfección y el crecimiento del virus en MDCK y huevos a 33°C, una temperatura permisiva para los virus ca y naturales para minimizar cualquier presión de selección mediante temperatura. Se confirmó el genotipo del virus mediante el análisis de la secuencia de los fragmentos de ADNc amplificados a partir del ARN vírico.

TABLA 6

Comparaciones de secuencias de A/AA76/60 "natural" y MDV-A

Segmento de ARN	Posición de la base (aminoácido)	E10SE2	MDV-A	rWT (Flu044)
PB2	141	A	G	A
	821 (265)	A (Asn)	G (Ser)	A
	1182	A	T	T
	1212	C	T	T
	1933	T	C	T
PB1	123	A	G	G
	1195 (391)	A (Lys)	G (Glu)	A
	1395 (457)	G (Glu)	T (Asp)	G
	1766 (581)	A (Glu)	G (Gly)	A
	2005 (661)	G (Ala)	A (Thr)	A
	2019	C	T	C
PA	20	T	C	T
	1861 (613)	A (Lys)	G (Glu)	G
	2167/8 (715)	TT (Leu)	CC (Pro)	TT
NP	146 (34)	A (Asp)	G (Gly)	G
	1550	'5A'	'6A'	'6A'
M	969 (M2-86)	G (Ala)	T (Ser)	G
NS	483 (NS1-153)	G (Ala)	A (Thr)	G
Los números en negrita representan las diferencias entre rMDV-A y rWt.				
Las palabras en negrita (15) son los cambios entre rmdv-a y rwt.				

Se determinaron las características fenotípicas mediante los procedimientos conocidos en la técnica, tal como se ha descrito anteriormente en la Patente de los Estados Unidos 6.322.967 de Parkin titulada "Recombinant tryptophan mutants of influenza" que se incorpora en el presente documento en su totalidad. De manera breve, se determinó la sensibilidad a la temperatura de los virus recombinantes mediante ensayo de placas en células MDCK a 33, 38 y 39°C. Se infectaron células MDCK en placas de 6 pocillo con 400 µl de virus diluido en serie 10 veces y se adsorbieron a temperatura ambiente durante 60 min. Se retiraron los inoculantes y se sustituyeron con 1xL15/MEM que contenía agarosa al 1% y 1 µg/ml de TPCK-tripsina. Se incubaron las células infectadas a 33°C en una estufa de CO₂ o en contenedores herméticos al agua que contenían CO₂ al 5% sumergidos en baños de agua en circulación mantenidos a 38 ± 0,1°C o 39 ± 0,1°C (Parkin y col. (1966). Se generaron mutantes del virus de la gripe A sensibles a la temperatura mediante genética inversa y se agruparon cargados para la mutagénesis de la alanina. Vir. Res. 46: 31-44). Después de tres días de incubación, se inmunotitularon las monocapas usando anticuerpos policlonales de MDV contra pollo y se enumeraron las placas. Se compararon los recuentos de placas obtenidos a cada una de las temperaturas para evaluar

ES 2 345 492 T3

el fenotipo ts de cada virus y se llevó a cabo cada ensayo un mínimo de tres veces. Se definió la temperatura de cierre como la temperatura más baja que producía una reducción de título de 100 veces o más en comparación con los 33°C.

Los virus infecciosos obtenidos de las células COS-7/MDCK cultivadas simultáneamente transfectados con los ocho plásmidos (pMDV-PB2, pMDV-PB1, pMDV-PA, pMDV-NP, pMDV-HA, pMDV-NA, pMDV-M, y pMDV-NS) se amplificaron en huevos con embrión de pollo, y se muestran por presentar las características del fenotipo ts del MDV- no recombinante, biológicamente derivado. Ningún MDV-A ni rMDV-A formó placas distintas a 39°C, aunque ambos formaron placas a 33°C fácilmente visualizadas.

TABLA 7

Replicación de MDV/Wt de genomas reordenados a diversas temperaturas

Virus con genes Wt	33° C	38° C	33° C/38° C	39° C	33° C/39° C
MDV	8,91	6,10	2,82	< 4,0 [†]	> 4,91
rMDV-A	8,72	6,19	2,53	< 4,0	> 4,72
Wt (E10SE2)	8,86	8,87	-0,01	8,87	-0,01
rWt (Flu064)	9,02	9,07	-0,05	8,96	0,06
Wt-PB2	8,46	7,87	0,59	5,80*	2,66
Wt-PB1	8,92	8,74	0,18	7,86*	1,06
Wt-NP	8,40	7,24	1,15	< 4,0	> 4,40
Wt-PA	8,57	6,10	2,48	< 4,0	> 4,57
Wt-M	8,80	6,68	2,12	< 4,0	> 4,80
Wt-NS	8,72	6,10	2,62	< 4,0	> 4,72
Wt-PB1/PB2	8,94	8,89	0,05	8,10*	0,85
Wt-PB1/PB2/NP	8,52	8,38	0,14	8,41	0,1
* Indica reducción en el tamaño de la placa en comparación con rWt.					
[†] El destacado indica que no se detectaron placas a una dilución de 10 ⁻⁴ veces					

Con el fin de llevar a cabo un análisis sistemático detallado de la base genética del fenotipo ts de MDV-A, se utilizaron para comparación las secuencias de diversas cepas A/AA/6/60 naturales sin ts, sin att, estrechamente relacionadas con 17-48 diferencias de nt a partir de A/AA/6/60 ca, incluyendo el aislado muy relacionado E10SE2 de A/AA/6/60 natural. Existen un total de 19 diferencias de nt entre E10SE2 y MDV-A (Tabla 6). Se demostró que E10SE2 no era ts (Tabla 7) y no era att en hurones. Con el fin de generar un virus sin ts recombinante, se alteraron los plásmidos de MDV-A mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento para incorporar 15 de las 19 diferencias que representan 10 cambios de aminoácidos. Cuatro de las posiciones de nucleótidos, PB2-1182, 1212, PB1-123, y NP-1550, que diferían entre MDV-A y E10SE2 no se alteraron a partir de la secuencia de MDV-A, debido a que se observaron estos nucleótidos en otros aislados sin ts de A/AA/6/60 y, por tanto, no se esperaba que tuvieran un papel en la expresión del fenotipo ts (Herlocher y col. (1996) Sequence comparisons of A/14A/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. Virus Research 42:11-25). Se obtuvo el virus recombinante (rWt, Flu064), que codificaba los 15 cambios de nucleótidos, de células COS-7/MDCK cultivadas simultáneamente transfectadas con un conjunto de 8 plásmidos, pWt-PB2, pWt-PB1, pWt-PA, pWt-NP, pWt-M, pMDV-HA, y pMDV-NA. El análisis de la secuenciación indicó que rWt contenía los cambios genéticos diseñados y no era ts a 39°C, idéntico a A/AA/6/60 natural biológicamente derivado. Estas observaciones demostraron que el fenotipo ts mapeó a un subconjunto de estos 15 cambios de nt.

Contribución de los seis segmentos génicos internos al fenotipo ts del virus

Se evaluó el efecto de cada segmento de gen natural en el fenotipo ts de MDV-A creando genomas reordenados de gen único recombinantes (Tabla 7). La introducción de PB2 natural en rMDV-A dio como resultado un virus que era únicamente no ts a 38°C, sin embargo, permaneció ts a 39°C. La reducción en el título del virus a 38°C y 39°C (con respecto a 33°C) fue de 0,6 log₁₀ y 2,7 log₁₀, respectivamente, tal como se midió mediante el ensayo de placas en células MDCK. El genoma reordenado que contenía el segmento del gen PB1 natural no era ts, con respecto a su

capacidad para formar placas a 38 y 39°C. El tamaño de la placa de este recombinante, sin embargo, estaba influenciado por el aumento de la temperatura y se redujo significativamente a 39°C en comparación con rWt. La introducción del segmento del gen NP natural en rMDV-A dio como resultado un virus que no era también ts a 38°C, pero en contraste el recombinante de PB2 natural, el segmento que contenía el segmento del gen NP natural no forma placas a 39°C. la introducción de los segmentos de los genes PA, M o NS naturales independientemente en rMDV-A no altera el fenotipo ts, indicando que estos tres segmentos génicos tenían un mínimo papel en el mantenimiento de este fenotipo.

Debido a que ni PB1 natural, PB2 natural o NP natural expresados individualmente en el fondo de MDV-A podrían crear una placa eficaz y un perfil de tamaño de placas idéntico a rWt sin ts, se introdujeron estos segmentos génicos en MDV-A en diversas combinaciones. La combinación de PB1 natural y PB2 natural dio como resultado un virus que no era ts a 38 y 39°C (Tabla 7). Aunque el tamaño de placa fue más grande que el de los ocho genomas reordenados con gen único, fue significativamente más pequeño que el de rWt. La tripe combinación de PB1/PB2/NP naturales en rMDV-A dio como resultado un virus que era similar o idéntico a rWt en la eficacia del plaqueo y el tamaño de la placa a 39°C. Por tanto, mientras que los segmentos de los genes PB2, PB1 y NP naturales invirtió únicamente parcialmente el fenotipo ts cuando se introdujo individualmente, la combinación de los tres segmentos génicos naturales fue capaz de invertir completamente el fenotipo ts a un comportamiento sin ts idéntico al de rWt.

Con el fin de determinar si estos 3 segmentos génicos eran capaces de impartir el fenotipo ts característico de MDV-A a rWt, se introdujeron los seis segmentos génicos internos derivados de MDV-A en rWt individualmente o en combinación. La introducción del segmento del gen PB1, PB2, o NP único en rWt dio como resultado una reducción del título del virus a 38°C y una reducción mayor a 39°C, sin embargo, ninguno de estos genomas reordenados de gen único estaba restringido a temperatura elevada como rMDV-A (Figura 10). Los segmentos de los genes PA, M y NS derivados de MDV-A no influyen el fenotipo sin ts de rWt. Consistentes con las reordenaciones de genoma anteriores, se demostró que la introducción de los genes PB1 y PB2 de MDV-A en el esqueleto de rWt aumento mucho el fenotipo ts del virus a 38°C; sin embargo, la inversión completa del fenotipo ts del virus requirió la adición del gen NP. De esta manera, los segmentos de los genes PB1, PB2 y NP derivados de MDV-A fueron importantes en conferir el fenotipo ts completo.

Mapeado de los loci genéticos que determinan el fenotipo ts de MDV-A

Las diferencias específicas entre los segmentos de los genes PB1, PB2 y NP de rWt y rMDV-A se dirigieron sistemáticamente a identificar aquellos cambios que jugaron un papel significativo en el fenotipo ts. El gen NP de rMDV-A difirió de NP de rWt únicamente en el nt 146 (G34D, Tabla 6). El gen PB2 de rMDV-A difirió del de rWt entre emplazamientos, pero únicamente el nt 821 dio como resultado un cambio de aminoácidos (N265S, Tabla 6) y representó presumiblemente el locus ts localizado en el segmento del gen PB2. El gen PB1 de MDV-A difirió del PB1 natural en 6 posiciones de nt, de las cuales 4 tenían cambios en la codificación (Tabla 6). Cada una de las sustituciones de los restos de aminoácidos naturales se sustituyó individualmente en el segmento del gen PB1 de rMDV-A para evaluar su papel en el fenotipo ts. 1395G (Glu-457) y 2005G (Ala) no afectaron el fenotipo ts de MDV-A. 1195^a (Lys-391) y 1766^a (Glu-581) dieron como resultado cada uno una ligera reducción en el fenotipo ts a 38°C, pero no tuvieron efecto a 39°C (Tabla 8). Estos datos indicaron que 1195A y 1766A fueron igualmente los loci ts en el segmento del gen PB1. Sin embargo, la combinación de 1195A y 1766A no produce un fenotipo ts similar al de PB1 natural (Tabla 6). La adición de 2005G pero no de 1395A a PB1-1195A/1766A disminuyó adicionalmente el fenotipo ts del virus a 39°C, demostrando que 2005A tuvo también un papel en la expresión del fenotipo ts especificado por el segmento PB1 de MDV-A.

TABLA 8

Mapeado de los restos de PB1 que determinan el fenotipo ts

Virus con secuencia natural	33° C	38° C	33° C/38° C log ₁₀ UFP/ml	39° C	33° C/39° C
rMDV-A	8,67	6,00	2,67	< 4,0 †	> 4,67
rWt	9,04	9,01	0,03	9,03	0,01
PB1-1195A	8,06	6,68	1,38	< 4,0	> 4,06
PB1-1395G	8,72	5,88	2,85	< 4,0	> 4,72
PB1-1766A	8,07	6,70	1,37	< 4,0	> 4,07
PB1-2005G	8,76	6,31	2,45	< 4,0	> 4,76
PB1-1195A1766A	8,65	7,60	1,05	5,98 *	2,68

ES 2 345 492 T3

TABLA 8 (continuación)

Virus con secuencia natural	33° C	38° C	33° C/38° C log ₁₀ UFP/ml	39° C	33° C/39° C
PB1-1195A1395G1766A	8,84	8,13	0,71	6,38*	2,46
PB1-1195A1766A2005G	8,79	8,12	0,66	7,14 *	1,64
PB1/PB2/NP	8,26	8,63	0,12	8,59	0,16
PB2/NP	8,81	8,21	0,59	7,56 *	1,25
PB1-1195A/PB2/NP	8,86	8,81	0,05	7,60 *	1,26
PB1-1766A/PB2rNP	9,33	8,84	0,50	8,71 *	0,62
PB1-1766A2005G/PB2/NP	8,30	8,22	0,08	8,11 *	0,18
PB1-176GA1395G/PB2SP	8,88	8,85	0,03	8,39 *	0,49
PB1-1195A1766A/PB2/NP	8,45	8,48	0,06	8,10	0,35

*Indica reducción en el tamaño de placa comparado con rWt.

† El valor destacado indica que no se detectaron placas a la dilución de 10⁻⁴.

A continuación se introdujeron mutaciones de emplazamiento único en PB1 junto con PB2 natural y NP natural en rMDV-A. PB2/NP Wt y rMDV-A de genoma reordenado no eran ts a 38°C y tenían una reducción del título de 1,25 log₁₀ a 39°C, pero su tamaño de placa era muy reducido en comparación con rWt. La adición de cualquiera de PB1-1195A o 1766A, no produjo cambios en el fenotipo de PB2 natural/NP de genoma reordenado. Únicamente la combinación de PB1-1195A y 1766A, junto con PB2 natural y NP natural, dio como resultado un virus que tenía el mismo fenotipo sin ts que PB1/PB2/NP natural y rMDV-A de genoma reordenado (Tabla 8). La adición de PB1-1395G o 2005G a PB1-1766/PB2/NP natural no convierte el virus en un rWt sin fenotipo ts característico. Estos datos demuestran, por tanto, que los cuatro aminoácidos distribuidos en los tres genes PB1, PB2 y NP podrían invertir completamente el fenotipo ts de MDV-A.

Restricción en la célula huésped de los virus MDV-A y de genoma reordenado

Adicionalmente a los fenotipos con sensibilidad a la temperatura y con atenuación presentados por el virus MDV-A y los virus de genoma reordenado con uno o más segmentos derivados de MDV-A tal como se ha descrito anteriormente, el virus MDV-A presentó restricción en la célula huésped tal como se indicó por el crecimiento reducido en células Per.C6 con respecto al crecimiento en células MDCK. Los virus MDV-A y de genoma reordenado con segmentos PB1 y PB2 derivados de MDV-A presentaron crecimiento significativamente reducido de células Per.C6 con respecto a su crecimiento en células MDCK, tal como se muestra en la Figura 20A y 20B.

Construcción mediante ingeniería genética de una cepa de virus sensible a la temperatura atenuada

Para determinar si los cinco aminoácidos identificados en los segmentos de los genes PB1m PB2 y NP de MDV-A podrían reproducir los fenotipos ts y att de MDV-A, se introdujeron PB1-391E, 581G, 661T, PB2-265S, NP-34G en una cepa de virus natural divergente (A/PR/8/34; 'PR8', y el virus resultante presentó una reducción de 1,9 log₁₀ en el título del virus a 38°C y una reducción de 4,6 log₁₀ a 39°C, que fue muy similar a la de rMDV-A (Figura 11).

La comparación de secuencias entre los genes PB1, PB2 y NP de A7AA/6/60 ca (MDV-A) y A/PR/8/34 demostró que los cuatro aminoácidos sustituidos identificados en los genes PB1 y PB2 de MDV-A son únicos. NP³⁴ se conserva entre MDV-A y PR8. Por tanto, los tres emplazamientos, PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G) y PB1⁶⁶¹ (A661T), identificados en el gen PB1 de MDV-A se introdujeron en PB1 de A/PR/8/34 y el PB2²⁶⁵ (N265S) se introdujo en PB2 de A/PR/8/34 mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento. Las mutaciones introducidas en los genes PB1 y PB2 se verificaron mediante el análisis de la secuenciación. En la Tabla 9, se relacionan las parejas de cebadores usados para la reacción de la mutagénesis. En la Figura 16 se muestran esquemáticamente estos virus.

TABLA 9

Cebadores usados para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8

HJ240	PR8-PB1 A1 195G	5' GAAAGAAGA TTGAAGAAA TCCGACCGCTC (SEC. DE ID N°: 79)
HJ241	PR8-PB1A1195G.as	5' GAGCGGTGCGATTCTTCAATCTTCTTTC (SEC. DE ID N°: 80)
HJ242	PR8-PB1A1766G	5' GAAATAAAGAAACTGTGGGGGCAAACCCGTFCC (SEC. DE ID N°: 81)
HJ243	PR8-PB1A1766G.as	5' GGAACGGGTTTGCCCCACAGTTTCTTTATTTC (SEC. DE ID N°: 82)
HJ244	PR8-PB1G2005A	5' GTATGATGCTGTFAACAACAACACACTC C (SEC. DE ID N°:83)
HJ245	PR8-PB1G2005A.as	5' GGAGTGTGTTGTTGTAACAGCATCATAC (SEC. DE ID N°:84)
HJ246	PR8-PB2A821G'	5' ATTGCTGCTAGGAGCATAGTGAGAAGAGC (SEC. DE ID N°:85)
HJ247	PR8-PB2A821G.as	5' GCTCTTCTCACTATGCTCCTAGCAGCAAT (SEC. DE ID N°:86)

Para examinar si las mutaciones ts introducidas en los genes PB1 y PB2 de PR8 confieren el fenotipo ts *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de minigenoma. El indicador del minigenoma de la gripe, designado pFlu-CAT, contenía el gen CAT de sentido directo negativo bajo el control del promotor pol I. la expresión de la proteína CAT dependió de la expresión de la proteínas PB1, PB2, PA, y NP de la gripe.

De manera breve, se transfectaron células HEp-2 con 1 µg de cada uno de PB1, PB2, PA, NP y el minigenoma de pFlu-CAT en lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de la incubación durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 33°C o 39°C, se analizaron los extractos celulares para la expresión de CAT mediante el kit ELISA de CAT (Roche Bioscience). Se midió el nivel de ARNm de CAT mediante el ensayo de extensión del cebador. A las 48 h después de la transfección, se extrajo el ARN celular total mediante el reactivo TRizol (Invitrogen) y se mezcló 1/3 de ARN con un cebador de ADN en exceso (5'-ARGTTCTTTACGATGCGATTGGG, SEC DE ID N°: 89) marcado en su extremo 5' con [³²P]-ATP y la polinucleótido quinasa T4 en 6 µl de agua. Tras desnaturalizar a 95°C durante 3 min, se llevó a cabo la extensión del cebador tras la adición de 50 U de transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen) en el tampón de reacción proporcionado con el enzima que contenía dNTP 0,5 mM durante 1 h a 42°C. Se analizaron los productos de la transcripción en geles de poliacrilamida al 6% que contenían urea 8 M en tampón TBE y se detectaron mediante autorradiografía.

Tal como se muestra en la Fig. 12A y B, el gen PB1 que transporta las tres sustituciones de aminoácidos (PR8-3s), PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G) y PB1⁶⁶¹ (A661T), tuvo actividad reducida a 33°C en comparación con el control PR8. Se observó una mayor reducción en la expresión de la proteína CAT (Fig. 12A) para este mutante a 39°C, indicando que el gen PB1 con los tres emplazamiento ts introducidos en MDV-A presentó replicación sensible a la temperatura en este ensayo *in vitro*. La introducción de PB2²⁶⁵ (N265S) en PR8 tuvo muy poco efecto en su actividad a temperaturas permisiva (33°C) y no permisiva (39°C) La combinación de PB1-3s y PB2-1s dio como resultado una mayor reducción en la actividad de la proteína (PR8-4s), que pareció incluso más ts que la de MDV-A. Tal como se esperaba, se detectó un bajo nivel de actividad (15%) en las células transfectadas con los genes PB1, PB2, PA, NP derivados de MDV-A a 39°C en comparación con A7AA/6/60 natural (A/AA natural).

Se generaron virus mutantes de PR8 y se recuperaron tal como se ha descrito anteriormente. De manera breve, se transfectaron células COS 7 y MDCK cultivadas simultáneamente con ocho plásmidos que codificaban los genes HA, NA, PB1, PB2, NP, M y NS de PR8 derivados de PR8. Para hacer que un virus transporte 4 loci ts (PR8-4s), se usaron PB1-3s que contenía tres cambios en PB1 en las posiciones de los nt 1195 (K391E), nt 1766 (E581G) y nt 2005 (A661T) y PB1-1s que contenía un cambio en PB2 en la posición 821 (N265S). Adicionalmente, se recuperaron también separadamente los virus PR8 que transportaban tanto tres mutaciones en PB1 (PR8-3s) como una mutación en PB2 (PR8-1s). En la Figura 16 se muestran esquemáticamente esto virus. Los cuatro virus mutantes recombinantes de PR8 crecieron a un título muy alto en huevos embrionarios, alcanzando un título de p,0 log10 ufp/ml o mayor tal como se muestra en la Tabla 10.

Para examinar la síntesis de proteínas víricas en células infectadas, se infectaron células MDCK con virus a una m.o.i de 5 y se marcaron las células con ³⁵S-Trans a las 7 h después de la infección durante 1 h. Se sometió a electroforesis el lisado celular marcado en gel de poliacrilamida al 1,5% que contenía SDS y se autorradiografió. Se estudió también la síntesis de proteínas mediante transferencia Western. Se cosecharon las células infectadas por el virus a las 8 h después de la infección y se sometieron a electroforesis en un gradiente del 4-15%. Se sondeó la transferencia con anticuerpo dirigido contra M1 o anticuerpo policlonal de MDV-A dirigido contra pollo, seguido por incubación con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Se detectaron bandas de proteína conjugadas con anticuerpo, mediante el Sistema de Detección Quimioluminiscente (Invitrogen) seguido por exposición de película a rayos X.

Tal como se muestra en la Fig. 19, todas tuvieron un nivel similar de síntesis de proteínas a 33°C sin embargo, a 39°C, el nivel de síntesis de proteínas se redujo ligeramente por PR8-1s, pero se redujo mucho para las células infectadas con PR8-3s y PR8-4s. El análisis de transferencia Western demostró también que se redujo la síntesis de proteínas en el orden de PR8-4s>PR8-3s>PR8-1s. De esta manera, la reducida replicación de los mutantes ts fue igualmente el resultado de su reducida replicación a las temperaturas no permisivas.

Se determinó la sensibilidad a la temperatura de los virus mutantes de PR8 mediante ensayo de placas en células MDCK a 33°C, 37°C, 38°C y 39°C. se amplificaron los virus recuperados en huevos embrionarios y se introdujeron en células tal como se ha descrito anteriormente. Tras la incubación de las células infectadas con virus durante tres días a las temperaturas designadas, se inmunotñieron las monocapas celulares usando anticuerpos policlonales de MDV contra polo y se enumeraron las placas. Se compararon los recuentos de placas obtenidos a cada temperatura para evaluar el fenotipo ts de cada virus. Se definió la temperatura de cierre como la temperatura más baja que presentó una reducción del título de 100 veces o más en comparación con los 33°C.

Tal como se muestra en la Tabla 10 y en la Fig. 17, todos los mutantes se replicaron bien a 33°C aunque se observó una ligera reducción en el título del virus. A 38°C, se observó una significativa reducción en el título del virus de todos los mutantes. A 39°C se observó una reducción en el título del virus mayor de 4,0 log₁₀ para los virus que transportan los tres loci ts en el gen PB1 (PR8-3s y PR8-4s). PR8 fue también ts a 39°C. El fenotipo ts de PR8-4s fue tan similar al de MDV-A que tuvo una reducción de 4,6 log₁₀ a 39°C en comparación con los 33°C Aunque los tres mutantes de PR8 no tuvieron una reducción mayor de 2,0 log₁₀ en el título del virus a 37°C, su morfología de la placa fue diferente de los de a 33°C. Tal como se muestra en la Fig. 18, el tamaño de la placa de cada mutante se redujo solo ligeramente a 33°C en comparación con PR8. Se observó una reducción significativa en el tamaño de la placa a 37°C para PR8-3s y mayor para PR8-4s. PR8 no tiene reducción significativa en el tamaño de la placa a 37°C. A 39°C, se observaron únicamente unas pocas placas identificadas para PR8-3s y PR8-4s. Se observó un tamaño de placa de aproximadamente el 30% del de PR8 natural para PR8-1s.

TABLA 10

Sensibilidad a la temperatura de PR8 con los loci de ts introducidos.
Título de virus (log₁₀ ufp/ml)

Virus	33° C	37° C	38° C	39° C
MDV-A	8,6	7,0	6,4	4*
Wt-A/AA	8,7	8,7	8,9	8,3
PR8	9,6	9,5	9,5	9
PB8-1s	9,4	8,9	7,7	7,4
PB8-3s	9,2	8,8	7,8	5,2
PB8-4s	9,5	7,8	7,1	4,4
Se asignó un título de 4,0 cuando no se detectaron virus a 10.000 diluciones.				

Se examinó la atenuación de los virus mutantes de PR8 en hurones. De manera breve, se usaron hurones macho de 9-10 semanas para evaluar la replicación del virus en los tractos respiratorios de un huésped animal. Se alojaron los hurones individualmente y se inocularon intranasalmente con 8,5 log₁₀ ufp de virus tres días después de la infección, se sedaron los hurones con cetamina HCL, se cosecharon los pulmones y los turbinados nasales (NT). Se diluyeron en serie homogenados de tejido pulmonar y se valoraron en huevos con embrión de polo de 10 días. Se calculó el título del virus (log₁₀ DIE₅₀/ml) en los pulmones mediante los procedimientos de Karber. Se determinó la replicación del virus en NT mediante el ensayo de placas y se expresó como log₁₀ ufp/ml.

Se midieron los niveles de replicación del virus en los pulmones y en los turbinados nasales mediante la DIE50 o los ensayos de placas (Tabla 11). Tres días después de la infección, se replicó PR8 a un nivel de 5,9 log₁₀ DIE50/gramo de tejidos pulmonares Sin embargo, PR8-1s presentó una reducción de 3,0 log₁₀ en la replicación de los pulmones de hurones y se detectó muy poca replicación para PR8-3s. No se detectó replicación para PR8-4s que se estudió en dos grupos de virus infectados con virus obtenido independientemente. El límite de detección del virus en pulmones de hurones mediante el ensayo de la DIE50 es 1,5 log₁₀ y de esta manera, se asignó un título de 1,5 log₁₀ de la DIE50 para PR8-4s Como control, MDV-A no se replica en pulmones de hurón y A/AA/6/60 natural se replicó a un título de 4,4 log₁₀. Se examinó la replicación del título en turbinados nasales (NT) mediante el ensayo de placas en células MDCK. PR8 se replicó a un título de 6,6 log₁₀ ufp/g en el hocico. Se observaron únicamente reducciones en el título del virus para PR8-1s y PR8-3s. Se observó una reducción de 2,2 log₁₀ par PR8-4s (A), mientras que se observó una reducción de 4,3 log₁₀ (B), que soportaba un cambio en el gen PB1

ES 2 345 492 T3

(E390G). La replicación muy reducida de PR8-4s (B) se correlaciona bien con su fenotipo ts a 37°C. Se usó una dosis infecciosa de 8,5 log₁₀ ufp aquí en vez de 7,0 log₁₀ ufp que se usó normalmente para evaluar el fenotipo de atenuación de MDV-A derivado de las vacunas de la gripe. Este resultado indicó que PR8 que transportaba los cuatro loci ts derivados de MDV-A estaba atenuado en la replicación en los tractos respiratorios inferiores de los hurones.

TABLA 11

Replicación de mutantes de PR8 en hurones

Virus	Hurones	Dosis (log ₁₀ ufp/ml)	Título de virus en pulmones (log ₁₀ DIE50/g ± SE)	Título de virus en turbinados nasales (log ₁₀ /g ± SE)
PR8	4	8,5	5,9 ± 0,3	6,6 ± 0,1
PR8-1s	4	8,5	3,8 ± 0,4	5,9 ± 0,2
PR8-3s	4	8,5	1,7 ± 0,1	5,8 ± 0,3
PR8-4s (A)	4	8,5	1,5 ± 0,0 ^a	4,6 ± 0,2
PR8-4s (B) ^b	4	8,5	1,5 ± 0,0	2,3 ± 0,3
MDV-A	4	8,5	1,5 ± 0,0	4,6 ± 0,1
Wt A/AA	4	8,5	4,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1
No se detectó virus y se asignó un título de virus de 1,5 log ₁₀ DIE750/g				
El virus contiene un cambio adicional en PB1-1193 (E390G)				

En los ensayos de ts y att, el virus mutante de PR8 presentó ambos fenotipos ts y att que fueron muy similares a los de MDV-A. Estos datos indican que la introducción de sustituciones de aminoácidos únicas del MDV-A en una cepa divergente del virus de la gripe da como resultado un virus que presenta los fenotipos sensible a la temperatura y atenuado deseables para producir, por ejemplo, vacunas atenuadas vivas. Adicionalmente, el virus PR8 ts, att, creció a un título mayor que el adecuado para uso como virus donante maestro para la producción de vacunas de la gripe atenuadas vivas o inactivadas. Estos resultados indican que las cinco mutaciones de MDV-A: PB1-391E, PB1-581G, PB1-661T, PB2-265S, y NP34G pueden impartir los fenotipos ts y att a cualquier cepa de la gripe A. Similarmente, se pueden producir novedosas cepas B ts, att, adecuadas para la producción de vacunas introduciendo las mutaciones de la cepa MDV-B en los virus de la cepa de la gripe B. Adicionalmente a la producción de vacunas de virus atenuados vivos, la introducción de estas mutaciones en las cepas donantes conducirá a la producción de vacunas inactivadas más seguras.

Ejemplo 5

Sistema de ocho plásmidos para la producción de MDV-B

Se extrajo el ARN vírico de una variante adaptada al frío de B/Ann Arbor/1/66 de la gripe (ca/master Ann Arbor/1/66 P1 Aviron 10/2/97), una cepa donante maestra de la gripe B a modo de ejemplo (MDV-B) a partir de 100 µl de fluido alantoico de huevos con embrión infectados usando el Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), y se eluyó el ARN en 40 µl de H₂O. Se llevó a cabo la PCR-RT de los segmentos genómicos usando el kit de la PCR-RT One Step (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo facilitado, usando 1 µl de ARN extraído para cada reacción. Se llevó a cabo la reacción de la RT 50 min a 50°C, seguido por 15 min a 94°C. Se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, y 72°C durante 3 min. Se amplificaron los genes P usando cebadores específicos de los segmentos con emplazamientos *BsmBI*, lo que dio como resultado la generación de dos fragmentos (Tabla 12).

Tabla 12. Cebadores de RT-PCR para la amplificación de los ocho ARNv de la cepa de gripe B/Ann Arbor/1/66.MI67.1

	Cebador directo	Cebador inverso
PB1 [1A]	Bm-PB1b-1: (SEC. DE ID N° 53) TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGGAGCCTTTAAGATG	Bm-PB1b-1200R: (SEC. DE ID N° 54) TATTCGTCTCGATGCCGTTCCCTTCTTCATTGAAGAATGG
PB1 [1B]	Bm-PB1b-1220: (SEC. DE ID N° 55) TATTCGTCTCGGCATCTTTGTGCGCCTGGGATGATGATG	Bm-PB1b-2369R: (SEC. DE ID N° 56) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCCTT
PB2 [2A]	Bm-PB2b-1: (SEC. DE ID N° 57) TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGGAGCGTTTCAAGATG	Bm-PB2b-1145R: (SEC. DE ID N° 58) TATTCGTCTCTCATTTTGTCTCTTTTAAATATTTCCCG
PB2 [2B]	Bm-PB2b-1142: (SEC. DE ID N° 59) TATTCGTCTCATGAGAATGGAAAACTACTAATAATTTCAGC	Bm-PB2b-2396R: (SEC. DE ID N° 60) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCATT
PA [3A]	Bm-Pab-1: (SEC. DE ID N° 61) TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGTGCGTTTGA	Bm-Pab-1261R: (SEC. DE ID N° 62) TATTCGTCTCCAGGGCCCTTTTACTTGTGTCAGAGTGC
PA [3B]	Bm-Pab-1283: (SEC. DE ID N° 63) TATTCGTCTCTCCTGGATCTACCAGAAAATAGGGCCAGAC	Bm-Pab-2308R: (SEC. DE ID N° 64) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGTCATT
HA	MDV-B 5'BsmBI-HA: (SEC. DE ID N° 65) TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATC	MDV-B 3'BsmBI-HA: (SEC. DE ID N° 66) ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTC
NP	Ba-NPb-1: (SEC. DE ID N° 67) TATTGGTCTCAGGGAGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGT	Ba-NPb-1842R: (SEC. DE ID N° 68) ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACACAGCATTTTTC
NA	MDV-B 5'BsmBI-NA: (SEC. DE ID N° 69) TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCAAAAC	MDV-B 3'BsmBI-NA: (SEC. DE ID N° 70) ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTCAG

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

(continúa)

	Cebador directo	Cebador inverso
M	MDV-B 5'BsmBI-M: (SEC. DE ID N° 71) TATTCGTCTCAGGAGCAGAACGACGACTTTCTTAAATG	MDV-B 3'BsmBI-M: (SEC. DE ID N° 72) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACGCACCTTTTCCAG
NS	MDV-B 5'BsmBI-NS: (SEC. DE ID N° 73) TATTCGTCTCAGGAGCAGAACGAGGATTGTTAGTC	MDV-B 3'BsmBI-NS: (SEC. DE ID N° 74) ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGGATTTTAT
Las secuencias complementarias de las secuencias de la gripe se muestran en negrita. Los extremos 5' tienen secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción <i>BsmBI</i> (Bm) o <i>BsaI</i> (Ba).		

Clonación de plásmidos

Se aislaron fragmentos de la PCR, se digirieron con *BsmBI* (o *BsaI* para NP) y se insertaron en pAD3000 (un derivado de pHW2000 que permite la transcripción de ARNv de sentido directo negativo y ARNm positivo) en el emplazamiento *BsmBI* tal como se ha descrito anteriormente. Se secuenciaron dos de cuatro de los plásmidos resultantes y se compararon con la secuencia consenso de MDV-B basándose en la secuenciación de los fragmentos de la PCR-RT directamente. Se “repararon” los plásmidos que tenían sustituciones de nucleótidos que daban como resultado cambios de aminoácidos diferentes de los de la secuencia consenso tanto mediante clonación de plásmidos como utilizando el kit Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA). Los plásmidos B/Ann Arbor/1/66 resultantes se designaron pAB121-PB1, pAB122-PB2, pAB123-PA, pAB124-HA, pAB125-NP, pAB126-NA, pAG127-M, y pAB128-NS. Usando este sistema de transcripción bidireccional se produjeron todos los ARN y proteínas víricas intracelularmente, dando como resultado la generación de virus de la gripe B infecciosos (Figura 4).

Es digno de atención que pAB121-PB1 y pAB124-HA tuvieron 2 y pAB128-NS tuvo 1 sustitución silenciosa de nucleótidos en comparación con la secuencia consenso (Tabla 13). Estos cambios de nucleótidos no dan como resultado alteraciones de aminoácidos y no se anticipan para afectar el crecimiento vírico y el rescate. Se han retenido estas sustituciones silenciosas para facilitar la genotipación de los virus recombinantes.

TABLA 13

Conjunto de plásmidos que representan los ocho segmentos de B/Ann Arbor/1/66 (MDV-B)

25

Seq.	plásmidos	nucleótidos	proteína
PB1	PAB121-PB1	A924 > G924; C1701 > T1701	silenciosa
PB2	PAB122-PB2	consenso	---
PA	PAB123-PA	consenso	---
HA	PAB124-HA	T150 > C150 ; T153 > C153	silenciosa
NP	PAB 125-NP	consenso	—
NA	PAB126-NA	consenso	---
M	PAB 127-M	consenso	---
NS	PAB128-NS	A416 > G416	NS1 : silenciosa

45

Para la construcción de los plásmidos con sustituciones de nucleótidos en los genes PA, NP, y M1, se usaron como plantillas los plásmidos pAV123-PA, pAB125-NP, pAB127-M. Se cambiaron los nucleótidos mediante el kit Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA). Alternativamente, se amplificaron dos fragmentos mediante la PCR usando cebadores que contenían las mutaciones deseadas, digeridos con *BsmBI* y se insertaron en pAD3000-*BsmBI* en una reacción de ligadura de tres fragmentos. Se secuenciaron los plásmidos generados para asegurar que el ADNc no contenían mutaciones no deseadas.

50

Se determinó la secuencia de la plantilla de ADN usando los kits de reacción listos para la secuenciación en ciclos con colorante finalizador Rodamina o dRodamina con la ADN polimerasa FS AmpliTaq® (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA). Se separaron las muestras mediante electroforesis y se analizaron en los secuenciadores de ADN PE/ABI modelo 373, modelo 373 Stretch, o el modelo 377.

55

En un experimento separado, se amplificó ARN vírico de B/Yamanashi/166/98 de la gripe y se clonó en pAD3000 tal como se ha descrito anteriormente con respecto a la cepa MDV-B, con la excepción de que se llevó a cabo la amplificación durante 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos. Se usaron cebadores idénticos para la amplificación de los segmentos de la cepa B/Yamanashi/166/98, con la sustitución de los siguientes cebadores para la amplificación de los segmentos NP y NA: **MDV-B 5'BsmBI-NP:** TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGTG (SEC DE ID N°: 75) y **MDV-B 3'BsmBI-NP:** ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACAGCATTTTCTTAC (SEC DE ID N°: 76) y **Bm-Nab-1:** TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCA (SEC DE ID N°: 77) y **Bm-Nab-1557R:** ATATCGTCTCGTATTAGTAGT **AACAAGAGCATTTT** (SEC DE ID N°: 78) respectivamente. Los plásmidos de B/Yamanashi/166/98 se designaron pAB251-PB1, pAB252-PB2, pAB253-PA, pAB254-HA, pAB255-NP, pAB256-NA, pAB257-M, y pAB258-NS.

65

Se identificaron tres diferencias de nucleótidos silenciosos en PA que facilitan la genotipación del virus recombinante y de B/Yamanashi/166/98 de genoma reordenado.

5 Ejemplo 6

Generación de virus recombinante infeccioso de la gripe B y de genoma reordenado de la gripe

Para superar los obstáculos encontrados en el intento de hacer crecer gripe B en un sistema de cultivo celular libre de virus auxiliar, la presente invención proporciona novedosos vectores y protocolos para la producción de virus de la gripe de la cepa B recombinantes y de genoma reordenado. El sistema vectorial usado para el rescate del virus de la gripe B se basa en el ya desarrollado para la generación del virus de la gripe A (Hoffmann y col. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad USA 97: 6108-6113; Hoffmann y Webster (2000) Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids J Gen Virol 81: 2843-7). Se cultivaron simultáneamente células 293T o COS-7 (células de primate con elevada eficacia de transfección y actividad poll) con células MDCK (per-
 10 misivas para el virus de la gripe), se mantuvieron las células 293T en medio OptiMEM I-AB que contenía células FBS al 5%, se mantuvieron las células COS-7 en medio DMEM I-AB que contenía FBS al 10%. Se mantuvieron las células MDCK en 1xMEM, FBS al 10% con la adición de agentes antibióticos y antimicóticos. Antes de la trans-
 15 fección con los vectores del genoma vírico, se lavaron las células una vez con 5 ml de PBS o medio sin PBS. Se añadieron diez ml de tripsina-EDTA hasta la confluencia de las células en un matraz de 75 cm² (se incubaron las células MDCK durante 20-45 min, se incubaron las células 293T durante 1 min). Se centrifugaron las células, y se volvieron a suspender en 10 ml de OptiMEM I-AB. A continuación se diluyó un ml de cada línea celular suspen-
 20 dida en 18 ml de OptiMEM I-AB, y se mezcló. Se distribuyeron alícuotas de las células en placas de 6 pocillos a 3 ml/pocillo. Después de 6-24 horas, se mezcló 1 µg de cada plásmido en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con OptiMEM I-AB con los plásmidos (x µl de plásmidos + x µl de OptiMEM I-AB + x µl de TransIT-LT1 = 200 µl); 2 µl de TransIT-LT1 por µg de ADN plásmido. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 45 min. A continuación se añadieron 800 µl de OptiMEM I-AB. Se retiró el medio de las células, y se añadió la mezcla de transfección a las células (t = 0) a 33°C durante 6-15 horas. Se retiró lentamente la mezcla de transfección de las células, y se añ-
 30 dió 1 ml de OptiMEM I-AB, y se incubaron las células a 33°C durante 24 horas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se añadió a las células 1 ml de OptiMEM I-AB que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina. A las 96 horas después de la transfección, se añadió a las células 1 ml de OptiMEM I-AB que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina.

Entre 4 días y 7 días después de la transfección se retiró 1 ml del sobrenadante del cultivo celular y se vigi-
 35 ló mediante ensayo de HA o de placas. De manera breve se distribuyó 1 ml de sobrenadante en alícuota en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se transfirieron novecientos µl de sobrenadante a un nuevo tubo, y se llevaron a cabo diluciones en serie a 500 µl/pocillo de células MDCK (por ejemplo, en placas de 12 pocillos). Se incubó el sobrenadante con la células durante 1 hora, y a continuación se eliminó, y se sus-
 40 tituyó con medio de infección (1xMEM) que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina. A continuación se llevaron a cabo el ensayo de placas o los ensayos de placas. Por ejemplo, para los ensayos de placas se valoraron los sobrenadantes en célula MDCK que se incubaron con una cubierta de agarosa al 0,8% durante tres días a 33°C. Para la infección de los huevos, se cosechó el sobrenadante de la células transfectadas seis o siete días después de la transfección, se inyectaron 100 µl de las diluciones del virus en OptiMEM en huevos con embrión de pollo de 11
 45 días a 33°C. se determinó el título tres días después de la inoculación mediante el ensayo de la DITC₅₀ en células MDCK.

Para generar MDV-B, se transfectaron tanto células 293T-MDCK como células COS-7-MDCK cultivadas simul-
 50 táneamente con 1 µg de cada plásmido. Cuando se examinaron a los 5 y 7 días después de la transfección las células MDCK cultivadas simultáneamente mostraron efectos citopáticos (CPE), indicando la generación de virus MDV-B infeccioso a partir del ADNc clonado. No se observaron CPE en las células transfectadas con siete plásmidos (Tabla 14). Para determinar la eficacia del sistema de transfección del ADN en la generación de virus, se valoraron los sobrenadantes de las células siete días después de la transfección en células MDCK y se determinó el título del virus mediante el ensayo de placas. El título del virus del sobrenadante de las células 293T-MDCK cultivadas simultáneamente fue
 55 de 5,0 x 10⁶ ufp/ml y 7,6 x 10⁶ ufp/ml en células COS7-MDCK.

60

65

TABLA 14

Generación de virus de la gripe B infeccioso a partir de ocho plásmidos

segmento	1	2	3	4
PBI	pABI21-PBI	---	PABI21-PBI	---
PB2	pAB122-PB2	pAB122-PB2	PAB122-PB2	pAB122-PB2
PA	pAB123-PA	pAB123-PA	pAB123-PA	pAB123-PA
HA	pAB124-HA	pAB124-HA	pAB124-HA	pAB124-HA
NP	pAB125-NP	pAB125-NP	pAB125-NP	pAB125-NP
NA	pAB126-NA	pAB126-NA	pAB126-NA	pAB126-NA
M	pAB127-M	pAB127-M	pAB127-M	pAB127-M
NS	pAB128-NS	pAB128-NS	pAB128-NS	pAB128-NS
células 293T-MDCK cultivadas simultáneamente con células COS-7-MDCK				
CPE	+	-	+	-
ufp/ml	$5,0 \times 10^6$	0	$7,6 \times 10^6$	0

Se transfectaron células 293T-MDCK cultivadas simultáneamente de manera transitoria (1,2) o células COS7-MDCK cultivadas simultáneamente (3,4) con siete u ocho plásmidos. Se vigiló el efecto citopático (CPE) siete días después de la transfección en células MDCK cultivadas simultáneamente. Siete días después de la transfección se valoraron los sobrenadantes de las células transfectadas en células MDCK. Los datos de ufp/ml representan el promedio de múltiples experimentos de transfección.

Se obtuvieron resultados comparables en los experimentos de transfección utilizando los vectores plásmidos de B/Yamanashi/166/98. Estos resultados muestran que el sistema de transfección permite la generación de virus de la gripe B reproducible *de novo* a partir de ocho plásmidos.

Genotipación de la gripe B recombinante

Tras un paso posterior en células MDCK, se usó la PCR-RT del sobrenadante de la célula infectadas para confirmar la autenticidad de los virus generados. Se llevó a cabo la PCR-RT con cebadores específicos de segmento para los ocho segmentos (Tabla 12). Tal como se muestra en la Figura 5A, se generaron los productos de la PCR para todos los segmentos. La secuenciación directa de los productos de la PCR de los segmentos PB1, HA, y NS desveló que los cuatro nucleótidos analizados eran los mismos que se encuentran en el plásmidos pAB121-PB1, pAB124-HA, y pAB128-NS. Estos resultados confirmaron que el virus generado se generó a partir de los plásmidos designados y excluye (adicionalmente a los controles negativos) cualquier posible contaminación de laboratorio con el virus parental (Figura 5B).

Similarmente, tras la transfección con los vectores plásmidos de B/Yamanashi/166/98, se recuperó el virus y se amplificó la región que abarcaba los nucleótidos 1280-1290 del segmento PA. La secuenciación confirmó que el virus recuperado correspondía a la B/Yamanashi/166/98 recombinante derivada de plásmido (Figuras 5C y D).

Fenotipación de rMDV-B

El virus MDV-B muestra dos fenotipos característicos: sensibilidad a la temperatura (ts) y adaptación al frío (ca). Por definición, una diferencia de 2 unidades logarítmicas (o mayor) en el título del virus a 37°C en comparación con a 33°C define ts, ca se define en menos de una diferencia de 2 unidades logarítmicas en el crecimiento del virus a 25°C en comparación con a 33°C. Se infectaron células primarias de riñón de pollo (PCK) con el virus MDV-B parental y con el virus transfectado derivado de plásmidos para determinar el crecimiento vírico a tres temperaturas.

Para el ensayo de placas se usaron células MDCK confluentes (ECACC) en placas de seis pocillos. Se incubaron las diluciones del virus durante 30-60 min a 33°C. Se cubrieron las células con una cubierta de agarosa al 0.8%.

ES 2 345 492 T3

Se incubaron las células infectadas a 33°C o 37°C. Tres días después de la infección se tiñeron las células con una disolución de cristal violeta al 0,1% y se determinó el número de placas.

Se llevó a cabo el ensayo del fenotipo ca-ts mediante valoración de la DITC₅₀ de las muestras de virus a 25, 33, y 37°C. Este formato de ensayo mide el título de la DITC₅₀ examinando el efecto citopático (CPE) del virus de la gripe en monocapas de células primarias de riñón de pollo en placas de cultivo celular de 96 pocillos a diferentes temperaturas (25°C, 33°C, 37°C). Este ensayo no es dependiente de la morfología de las placas, que varía con la temperatura y las cepas de virus; en vez de estos es únicamente dependiente de la capacidad del virus de la gripe de replicarse y producir CPE. La suspensión de células primarias de riñón de pollo (PCK), preparada mediante tripsinización del tejido primario, se suspendió en medio MEM (de Earl) que contenía FCS al 5% se sembraron las células PCK en placas de cultivo de 96 pocillos durante 48 horas con el fin de preparar una monocapa con una confluencia > 90%. Después de 48 h, la monocapa de células PCK se lavó durante una hora con medio MEM libre de suero que contenía L-Glutamina 5 mM, antibióticos, aminoácidos no esenciales, denominado Medio de Ensayo de Fenotipo (PAM). Se prepararon diluciones en serie de 10 veces de las muestras de virus en bloques de 96 pocillos que contenían PAM. A continuación se plaquearon las muestras de virus diluidas sobre la monocapa de PCK lavada en la placas de 96 pocillos. En cada dilución de la muestra de virus, se usaron seis pocillos replicados para la infección con el virus diluido. Se incluyeron células sin infectar como control celular como 6 pocillos replicados para cada muestra. Se valoró cada muestra de virus en 2-4 réplicas. Se incluyó el virus control del fenotipo con títulos predeterminados a 25°C, 33°C, y 37°C, en cada ensayo. Con el fin de determinar el fenotipo ts de las muestras de virus, se incubaron las placas durante 6 días a 33°C y 37°C en estufas de cultivo celular con CO₂ al 5%. Para la caracterización del fenotipo se incubaron las placas a 25°C durante 10 días. Se calculó el título del virus mediante el Procedimiento Karber y se informó como el Promedio del Log₁₀ (n = 4) de la DITC₅₀ Título/ml ± Desviación Estándar. Las desviaciones estándar de los títulos de virus presentados en la Fig. 1-3 osciló desde 0,1 a 0,3. Las diferencias en el título del virus a 33°C y 37°C se usaron para determinar el fenotipo ts y las diferencias en el título a 25°C y 33°C se usaron para determinar el fenotipo ca.

El virus MDV-B recombinante derivado de plásmido (recMDV-B) expresó los dos fenotipos característicos en el cultivo celular, ca y ts, tal como se esperaba. El fenotipo ca, de replicación eficaz a 25°C, se midió funcionalmente como un diferencial en el título entre 25°C y 33°C de menos de o igual a 2 log₁₀ cuando se evaluó en células PCK. El MDV-B parental y el recMDV-B expresaron ca; la diferencia entre 25°C y 33°C fue de 0,3 y 0,4 log₁₀, respectivamente (Tabla 15). Se midió también el fenotipo ts observando los títulos a dos temperaturas diferentes en células PCK; para este fenotipo, sin embargo, el título a 37°C debería ser menor que el título a 33°C en 2 log₁₀ o más, la diferencia entre 33°C y 37°C para el MDV-B parental y el recMDV-B fue de 3,4 y 3,7 log₁₀, respectivamente (Tabla 15). De esta manera, el virus MDV-B derivado de plásmido recombinante expresó los fenotipos ca y ts.

El virus recombinante tuvo un título de 7,0 log₁₀ de la DITC₅₀/ml a 33°C y 3,3 log₁₀ de la DITC₅₀ a 37°C y 8,8 log₁₀ de la DITC₅₀/ml a 25°C (Tabla 15). De esta manera, el virus recombinante derivado de la transfección con los ocho plásmidos de los segmentos del genoma del MDV-B de la gripe tiene el fenotipo ca y ts.

TABLA 15

Ensayo del fenotipo en MDV-B y rMDV-B generados a partir de plásmidos

Virus	Temperatura (0° C)			Fenotipo
	25	33	37	
	Log ₁₀ DIT50/ml		(Promedio + SD)	
ca B/Ann Arbor/O1/66 (MDV-B)	8,8 + 0,3	8,5 + 0,05	5,1 + 0,1	ca, ts
RecMDV-B	7,4 + 0,3	7,0 + 0,13	3,3 + 0,12	ca, ts
Rec53-MDV-B	5,9+0,1	5,7 + 0,0	5,3+0,1	ca, no ts

Las células primarias de riñón de pollo se infectaron con el virus MDV-B parental y el virus recombinante derivado de plásmidos (recMDV-B). El título de virus se determinó a tres temperaturas diferentes.

Ejemplo 7

Producción de virus B/Yamanashi 166/98 de genoma reordenado

Se amplificaron los segmentos HA y NA de diversas cepas diferentes que representan los linajes principales de la gripe B y se clonaron en pAD3000, esencialmente tal como se ha descrito anteriormente. Se optimizaron los cebadores para la amplificación simultánea de la PCR-RT de los segmentos HA y NA. La comparación de las regiones terminales

del ARNv que representa la región no codificante del segmento 4 (HA) y del segmento 6 (NB/NA) desveló que los 20 nucleótidos terminales en el extremo 5' y los 15 nucleótidos en el extremo 3' fueron idénticos entre los genes HA y NA de los virus de la gripe B. Se sintetizó una pareja de cebadores para la PCR-RT (las secuencias subrayadas son específicas del virus de la gripe B) Bm-NAb-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG CA (SEC DE ID N°: 87; Bm-NAb-1557R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AAC AAG AGC ATT TT (SEC DE ID N°: 88) y se usó para amplificar simultáneamente los genes HA y NA de diversas cepas de gripe B (Fig. 8). Se aislaron los fragmentos HA y NA de la PCR de B/Victoria/504/2000, B/Hawaii/10/2001, y B/Hong Kong/330/2001, se digirieron con BsmBI y se insertaron en pAD3000. Estos resultados demostraron que la aplicabilidad de estos cebadores par la generación eficaz de plásmidos que contienen los genes HA y NA de la gripe B de diversos virus naturales diferentes que representan los linajes principales de la gripe B.

Con el fin de demostrar la utilidad de B/Yamanashi/166/98 (un virus del tipo B/Yamagata/16/88) para expresar eficazmente antígenos de diversos linajes de la gripe B, se generaron genomas reordenados que contenían PB1, PB2, PA, NP, M, NS de B/Yamanashi/166/98 y los HA y NA de las cepas que representan lo linajes Victoria y Yamagata (genomas reordenados 6+2). Se transfectaron simultáneamente células COS7-MDCK cultivadas simultáneamente de manera transitoria con seis plásmidos que representaban B/Yamanashi/166/98 y dos plásmidos que contenían el ADNc de los segmentos HA y NA de dos cepas procedentes del linaje B/Victoria/504/2/87, B/Hong Kong/330/2001 y B/Hawaii/10/2001, y una cepa procedente del linaje B/Yamagata/16/88, B/Victoria/504/2000, de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Seis a siete días después de la transfección, se valoró el sobrenadante de las células MDCK recientes. Los tres virus de genoma reordenado 6+2 tenían títulos entre $4 - 9 \times 10^6$ ufp/ml (Tabla 16). Estos datos demostraron que los seis genes internos de B/Yamanashi/166/98 podrían formar eficazmente virus infecciosos con los segmentos de los genes HA y NA procedentes de los linajes de la gripe B.

Se valoraron los sobrenadantes de las células COS7-MDCK cultivadas simultáneamente seis o siete días después de la transfección y se determinó el título vírico mediante los ensayos de placas en células MDCK.

TABLA 16

Conjunto de plásmidos usados para la generación de los genomas reordenados de B/Yamanashi/166/98 y 6 + 2

Segmento						
1	---	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1
2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2
3	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA
4	pAB254-HA	pAB254-HA	pAB281-HA	pAB285-HA	pAB287-HA	
5	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP
6	pAB256-NA	pAB256-NA	pAB291-NA	pAB295-NA	pAB297-NA	
7	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M
8	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA
Virus recombinante		8 B/Yamanashi/166/98	6 + 2 B/Victoria/504/2000	6 + 2 B/Hawaii/10/2001	6 + 2 B/Hong Kong/330/2001	
ufp/ml ^a		0	4×10^6	9×10^6	6×10^6	7×10^6

Se obtuvieron valores relativamente elevados mediante replicación de B/Yamanashi/166/98 natural en huevos. Se llevaron a cabo experimentos para determinar si esta propiedad era un fenotipo inherente de los seis genes "internos" de este virus. Para evaluar esta propiedad, el rendimiento de B/Victoria/504/2000 natural, que se replicó solo moderadamente en huevos, se comparó con el rendimiento del genoma reordenado 6+2 que expresa los HA y NA de B/Victoria/504/200. Se inocularon cada uno de esto virus adicionalmente a B/Yamanashi/166/98 natural y recombinante en 3 ó 4 huevos con embrión de pollo a cualquiera de 100 o 100 ufp. Tres días después de la infección, se cosecharon los fluidos alantoicos procedentes de los huevos y se determinaron los títulos de la DITC₅₀ en células MDCK. Los genomas reordenados 6+2 produjeron cantidades similares de virus en el fluido alantoico que la cepa B/Yamanashi/166/98 natural y recombinante (Fig. 9). La diferencia en el título entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6+2 fue aproximadamente de $1,6 \log_{10}$ de la DITC₅₀ ($0,7-2,5 \log_{10}$ de la DITC₅₀/ml, 95% de CI). La diferencia entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6+2 se confirmó en tres experimentos separados ($P < 0,001$). Estos resultados demostraron que se podrían conferir las propiedades de crecimiento en huevo de B/Yamanashi/166/98 a los antígenos de HA y NA que se expresan normalmente a partir de cepas que se replican mal en huevos.

Ejemplo 8

Base molecular para la atenuación de B/Ann arbor/1/66 CA

- 5 El virus MDV-B (B/Ann Arbor/1/66) que está atenuado en seres humanos, muestra un fenotipo atenuado en huro-
nes y muestra un fenotipo adaptado al frío y sensible a la temperatura en cultivo celular. Las secuencias de aminoácidos
deducidas de los genes internos de MDV-B se compararon con las secuencias en la base de datos de la gripe de Los
Alamos en la world wide web at:flu.lanl.gov) usando el algoritmo de búsqueda BLAST. Se identificaron ocho únicos
10 aminoácidos de MDV-B, y que no se presentan en ninguna otra cepa (Tabla 17). Los segmentos del genoma que co-
difican PB1, BM2, NS1, y NS2 no muestran restos únicos sustituidos. Las proteínas PA y M1 tienen cada una dos,
y la proteína NP tiene cuatro aminoácidos únicos sustituidos (Tabla 17). Un aminoácido sustituido se encuentra en
PB2 en la posición 630 (una cepa B/Harbin/7/94 adicional (AF170572) tiene también un resto arginina en la posición
630).
- 15 Estos resultados sugirieron que los segmentos de los genes PB2, PA, NP y M1 pueden estar implicados en el fe-
notipo atenuado de MDV-B. De una manera análoga a la descrita anteriormente par MDV-A, se puede utilizar el sistema
de ocho plásmidos para generar recombinantes y genomas reordenados (único y/o doble, es decir, genomas reorde-
nados 7:1; 6:2) en un auxiliar independiente de manera sencilla mediante transfección simultánea de los plásmidos
relevantes en células cultivadas tal como se ha descrito anteriormente con respecto a MDV-A. Por ejemplo, se pueden
20 usar los 6 genes internos de B/Lee/40 en conjunción con los segmentos HA y NA derivados de MDV-B para generar
genomas reordenados 6+2.

TABLA 17

Aminoácidos con sustitución única en B/Ann Arbor/1/66

30	Nº			ca	B/Ann	Secuencias alineadas		Número	de
				Arbor/1/66		(virus de tipo natural)			secuencias alineadas
	pos.			aminoácido	codón	aminoácido	codón		
35	PB1	0		-		-		23	
	PB2	1	630	Arg630	<u>AGA</u>	Ser630	<u>AGC</u>	23	
	PA	2	431	Met431	<u>ATG</u>	Val431	<u>GTG</u>	23	
40			497	His497	<u>CAT</u>	Tyr497	<u>TAT</u>		
	NP	4	55	Ala55	<u>GCC</u>	Thr55	<u>ACC</u>	26	
			114	Ala114	<u>GCG</u>	Val114	<u>GTG</u>		
45			410	His410	<u>CAT</u>	Pro410	<u>CCT</u> , <u>CCC</u>		
			509	Thr509	<u>GAC</u>	Ala509	<u>GGC</u>		
	M1	2	159	Ga159	<u>CAA</u>	His159	<u>CAT</u>	24	
50			183	Val183	<u>GTG</u>	M183	<u>ATG</u>		
	BM2	0		-		-		24	
	NS1	0		-		-		80	
55	NS2	0		-		-		80	

Se usó la secuencia de aminoácidos deducida de ocho proteínas de ca B/Ann Arbor en una búsqueda
BLAST. Se muestra la posición de cada aminoácido diferente entre MDV-B y las secuencias alineadas. Los
60 nucleótidos de los codones subrayados representan las posiciones sustituidas

Con el fin de determinar si las 8 únicas diferencias tuvieron algún impacto en las características de los fenotipos
B, se construyó un virus recombinante en el que las ocho posiciones de nucleótidos codifican los aminoácidos que
65 reflejan el complemento genético de la gripe natural. Se construyó un conjunto de plásmidos en el que los ocho
restos de los genes PA, NP, y M1 se cambiaron mediante mutagénesis dirigida al emplazamientos para reflejar los
aminoácidos naturales (tal como se indicó en la Tabla 17) Se generó un recombinante con ocho cambios, designado

rec53-MDV-B mediante transfección simultánea de los plásmidos contruidos en células COS7-MDCK cultivadas simultáneamente. El cultivo simultáneo de células MDCK y el crecimiento a 33°C aseguraron que el sobrenadante contenía elevados títulos de virus seis a siete días después de la transfección. Se valoraron los sobrenadantes de las células transfectadas y se determinó el título en células MDCK mediante el ensayo de placas y células PCK a 33°C y 37°C.

Tal como se muestra en la Fig. 13, en dos experimentos diferentes, recMDV-B expresó el fenotipo ts en células MDCK y en células PCK. El virus con triple genoma reordenado designado rec53-MDV-B que alojaba los ocho cambios de aminoácidos expresó el fenotipo sin ts, la diferencia en el título entre 33°C y 37°C fue solo de 0,7 log₁₀ en células PCK. Este título fue inferior de la diferencia de 2 log₁₀ requerida característica de la definición de ts y significativamente inferior del de la diferencia de 3 log₁₀ observada con recMDV-B. Estos resultados muestran que la alteración de los ocho aminoácidos en el interior de las proteínas PA, NP y M1 era suficiente para generar un virus de tipo natural, sin ts con ambas glicoproteínas homólogas y heterólogas.

A continuación se determinó la contribución de cada segmento génico al fenotipo ts. Se generaron los recombinantes derivados de plásmidos que alojaban cualquiera de los segmentos del gen PA, NP, o M con el complemento de aminoácidos naturales mediante la técnica de transfección simultánea del ADN. Todos los recombinantes con gen único presentaron restricción al crecimiento a 37°C en células MDCK y en células PCK (Fig. 14) indicando que los cambios en un segmento génico único fueron capaces de revertir el fenotipo ts. Adicionalmente, los virus recombinantes que transportan los segmentos de los genes NP y M o PA y M conjuntamente retuvieron también el fenotipo ts. En contraste, los virus recombinantes que albergaban los segmentos de los genes PA y NP tuvieron una diferencia en el título entre 37°C y 33°C de 2,0 log₁₀ o inferior, similar a la de rec53-MDV-B. Estos resultados muestran que los genes NP y PA tienen una mayor contribución al fenotipo ts.

Para determinar si el total de los cuatro aminoácidos en la proteína NP y dos en la proteína PA contribuyen a recombinantes de triple gen y doble gen, sin ts, se generaron genes NP y PA alterados (Fig. 15). La sustitución de dos aminoácidos en la proteína NP, A114→V114 y H410→P410 dio como resultado un fenotipo sin ts. Los virus con una única sustitución H410→P410 en la nucleoproteína no mostraron fenotipo ts en MDCK y PCK. Por otra parte, la sustitución única A55→T55 mostró un fenotipo ts, tal como hizo la sustitución única en la posición 509. Estos resultados indican que los restos aminoácidos V114 y P410 en NP están implicados en el crecimiento eficaz a 37°C (Fig. 21A). Se empleó una estrategia similar para diseccionar la contribución de los dos aminoácidos en el gen PA. Se construyó un conjunto de recombinantes, alojando cada uno un segmento del gen NP con cuatro aminoácidos consenso naturales y un gen PA únicamente con uno de los dos aminoácidos consenso naturales. La sustitución de H497→Y497 siguió siendo ts (Fig. 21B), demostrando que este locus tiene poco impacto sobre la expresión del fenotipo. En contraste, la sustitución de M431 con V431 dio como resultado una reversión del fenotipo ts. Estos resultados muestran que los aminoácidos A114 y H410 en NP y M431 en PA son los principales determinantes para la sensibilidad a la temperatura de MDV-B.

Basándose en la anterior evidencia, un fenotipo ts y un fenotipo atenuado están muy correlacionados. Está bien establecido que el virus B/Ann Arbor/1/66 ca no es detectable en el tejido pulmonar de hurones infectados, mientras que los virus de la gripe B no atenuados son detectables en los pulmones tras la infección nasal. Para determinar si una mutación idéntica sustenta los fenotipos ts y att, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

Los virus recombinantes obtenidos después de la transfección se pasaron en huevos con embrión de pollo para producir un depósito de virus. Se inocularon hurones de nueve semanas de edad intranasalmente con 0,5 ml de virus por orificio nasal con títulos de 5,5, 6,0 o 7,0 log₁₀ ufp/ml. Tres días después de la infección se sacrificaron los hurones y se examinaron sus pulmones y turbinados tal como se ha descrito anteriormente.

Se infectaron los hurones (cuatro animales en cada grupo) intranasalmente con recMDV-B o rec53-MDV-B. Tres días después de la infección del virus se cosecharon los turbinados nasales y el tejido pulmonar y se ensayó la existencia de virus. No se detectaron virus en los tejidos pulmonares de los hurones infectados con 7,0 log₁₀ ufp de recMDV-B. De los cuatro animales infectados con virus rec53-MDV-B con 7,0 log₁₀ ufp se detectó virus en tres animales en el tejido pulmonar (un animal en este grupo por razones desconocidas). En dos de cuatro tejidos pulmonares de los hurones infectados con rec53-MDV-B a una dosis más baja (5,5 log ufp/ml) se podría aislar virus del tejido pulmonar. De esta manera, el cambio de ocho únicos aminoácidos en la proteína PA, NP, y M1 en los restos naturales fue suficiente para convertir un fenotipo att en un fenotipo sin att.

Debido a que los datos en el cultivo celular mostraron que PA y NP eran los principales contribuyentes para el fenotipo ts, en un segundo experimento, se infectaron los hurones con rec53-MDV-B (PA, NP, M), rec62-MDV-B (PA), rec71-MDV-B (NP) con 6 log pfu. Dos de cuatro animales infectados con rec53-MDV-B tuvieron virus en el pulmón. Ninguno de los tejidos pulmonares de los hurones infectados con virus con un único o doble genoma reordenado tuvo niveles detectables de virus. De esta manera, adicionalmente a los aminoácidos en las proteínas PA y NP, la proteína M1 es importante para el fenotipo att. Los virus con PA y NP naturales no se replican en el pulmón del hurón, indicando que un subconjunto de mutaciones implicadas en la atenuación está implicado en el fenotipo ts.

ES 2 345 492 T3

De esta manera, se determinaron los fenotipos ts y att de B/Ann Arbor/1/66 en al menos tres genes. La conversión de ocho aminoácidos en la proteína PA, NP, y M1 en restos naturales dio como resultado un virus recombinante que se replicó eficazmente a 37°C. Similarmente, un virus recombinante 6+2 que representaba los seis genes internos de MDV-B con los segmentos HA y NA de B/Hong Kong/330/01 mostró un fenotipo ts y el recombinante triple no era ts.

Los resultados de los inventores usando la estructura de MDV-B indicaron que seis aminoácidos fueron suficientes para convertir un fenotipo ts/att en un fenotipo sin ts/sin att. Por tanto los inventores se interesaron en determinar si la introducción de aquellos seis restos de "atenuación" podría transferir estas propiedades biológicas a un virus de la gripe B no atenuado natural heterólogo, tal como B/Yamanashi/166/98.

Se produjeron B/Yamanashi/166/98 natural recombinante (recYam) (7) y un virus recombinante (rec6-Yam): con seis cambios de aminoácidos PA (V431→M431, H497→Y497), NP (V114→A114, P410→H410), y M1 (H159→Q159, M138→V183). RecYam mostró una reducción del título de 0,177 log10 en el título a 37°C en comparación con a 33°C, mientras que rec6Yam fue claramente ts, la diferencia en el título vírico entre 37°C y 33°C fue de 4,6 log10. Se recuperó eficazmente el virus a partir de los hurones infectados con recYam, tal como se esperaba para un virus de la gripe B natural típico. Cuando se inoculó rec6Yam en los hurones, no se detectaron virus en los tejidos pulmonares (Tabla 18). De esta manera, la transferencia de los loci ts/att desde MDV-B es suficiente para transferir los fenotipos ts y att a un virus divergente.

TABLA 18

Estudios de atenuación en hurones

Virus recombinante	Componentes naturales ^a	Fenotipo ts	Hurones	Dosis [log10 ufp]	Turbinados nasales ^b [log10ufp/g]	Tejido pulmonar [log10DIE/g] ^c
rMDV-B	ninguno	ts	4	6,0	4,01	< 1,5
rec53-B	NP, PA, M	No ts	4	6,0	4,65	3,81
rec62-B	NP, PA	No ts	4	6,0	4,69	< 1,5
rec71NP-B	NP	ts	4	6,0	4,13	<1,5
rec71M-B	M	ts	4	6,0	4,17	< 1,5
RecYam		No ts	4	6,0	4,92	3,31
rec6Yam		ts	4	6,0	4,02	< 1,5

^a Se usaron virus recombinantes con estructura de MDV-B que se diferencian en aminoácidos naturales (ver detalles en la tabla 2) para infectar hurones intranasalmente. RecYam es B/Yamanashi/166/98 recombinante y Rec6Yam representa un virus que tiene seis cambios de aminoácidos para 'atenuación de MDV-B' en NP, PA, y M1 con estructura de B/Yamanashi.

^b Tres días después de la infección, se determinaron los títulos de virus en turbinados nasales y tejido pulmonar, se muestra el promedio de cuatro hurones infectados

^c < 1,5 indica que no se detectaron virus.

Tal como se ha descrito anteriormente con respecto a las cepas de gripe A, la sustitución de estos restos indicados anteriormente, por ejemplo PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A), NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V), confiere los fenotipos ts y att. De acuerdo con esto, variantes construidas artificialmente mediante ingeniería genética de la cepa del virus de la gripe B que tiene una o más de estas sustituciones presentan los fenotipos ts y att y son adecuadas para el uso, por ejemplo, como cepas de virus donantes maestros, en la producción de vacunas de virus de la gripe atenuados vivos.

Ejemplo 9

Rescate de la gripe a partir de ocho plásmidos mediante electroporación de células vero

Anteriormente se ha sugerido que se puede rescatar la gripe A recombinante a partir de células Vero (Fodor y col. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA J. Virol. 73: 9679-82; Hoffmann y col. (2002) Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccine Vaccine 20: 3165-3170). El procedimiento informado requiere el uso de reactivos lípidos y se ha documentado únicamente para una única cepa de las cepas de laboratorio de replicación muy competente de la gripe A (A/WSN/33 y A/PR/8/34), haciendo ésta de limitada aplicación en la producción de virus atenuado vivo adecuado para la producción de vacunas. La presente invención proporciona un novedoso procedimiento para recuperar virus de la gripe recombinante a partir de células Vero usando la electroporación. Estos procedimientos son adecuados para la producción de virus de la cepa de la gripe A y de la gripe B, y permite la recuperación de, por ejemplo, virus adaptados al frío, sensibles a la temperatura, atenuados a partir de células Vero que crecen en condiciones libres de suero que facilitan la preparación de vacuna atenuada viva adecuada para la administración en, por ejemplo, formulaciones de vacuna intranasales. Adicionalmente a su amplia aplicabilidad a través de las cepas de virus, la electroporación no requiere reactivos adicionales diferentes de los del medio de crecimiento para el sustrato celular y de esta manera tiene un potencial inferior para contaminantes no deseados. En particular, este procedimiento es efectivo para generar virus recombinantes y de genoma reordenado que usan células Vero adaptadas a crecer en condición libre de suero, tal como aislados de células Vero calificados como libres de patógenos y adecuados para la producción de vacunas. Esta característica apoya la elección de la electroporación como un procedimiento apropiado para la introducción comercial de ADN en los sustratos celulares.

Se comparó la electroporación con una variedad de procedimientos para la introducción de ADN en células vero, incluyendo la transfección usando numerosos reactivos basados en lípidos, la precipitación con fosfato de calcio y la microinyección celular. Aunque se obtuvieron algunos éxitos usando reactivos basados en lípidos para el rescate de la gripe A, únicamente se demostró que la electroporación rescataba la gripe B así como la gripe A a partir de células Vero.

Un día antes de la electroporación, se dividieron las células Vero confluentes en un 90 - 100%, y se sembraron a una densidad de 9×10^6 células por matraz T225 en MEM suplementado con pen/estrep, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y FBS al 10% (MEM, FBS al 10%). El siguiente día, se tripsinizaron las células y se volvieron a suspender en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por matraz T225. A continuación se aglomeraron las células y se volvieron a suspender en 0,5 ml de OptiMEM I por matraz T225. Opcionalmente, se puede emplear medio OptiMEM adaptado que contenga componentes no humanos o derivados de animal (se puede obtener éste a partir del fabricante de OptiMEM I tras solicitud). Tras la determinación de la densidad celular, por ejemplo, mediante recuento a una dilución 1:40 en un hemocitómetro, se añadieron 5×10^6 células en una cubeta de electroporación de 0,4 cm a un volumen final de 400 μ l de OptiMEM I. A continuación se añadieron a las células en la cubeta veinte μ g de ADN constituido por una mezcla equimolar de ocho plásmidos que incorporan cualquiera del genoma de MDV-A o MDV-B en un volumen de no más de 25 μ l. Se mezclaron las células suavemente mediante golpecitos y se electroporaron a 300 voltios, 950 microfaradios en un Pulsador génico II de BioRad conectado a un Extensor Plus de capacitancia (BioRad, Hercules, CA). La constante de tiempo debe estar en el intervalo de 28 - 33 ms.

Se mezclaron suavemente los contenidos de la cubeta mediante golpecitos y 1-2 min después de la electroporación, se añadieron 0,7 ml de MEM FBS al 10%, con una pipeta de 1 ml. Se mezclaron suavemente las células de nuevo pipeteando y retirando una pocas veces y a continuación se dividieron entre dos pocillos de una placa de seis pocillos que contenía 2 ml por pocillo de MEM, FBS al 10%. A continuación se lavó la cubeta con 1 ml de MEM, FBS al 10% y se dividió entre los dos pocillos para un volumen final de aproximadamente 3,5 ml por pocillo.

En experimentos alternativos, células Vero adaptadas a condiciones de crecimiento libres de suero, por ejemplo, en OptiPro (SFM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se electroporaron tal como se ha descrito anteriormente excepto que en la siguiente electroporación en OptiMEM I, se diluyeron las células en OptiPro (SFM) en el que se cultivaron posteriormente para el rescate del virus. Experimentos posteriores han demostrado que, tras la electroporación, se pueden diluir las células en OptiMEM I o en medio OptiMEM adaptado que contenga componentes no humanos o derivados de animales.

Las células electroporadas se hicieron crecer a continuación en condiciones apropiadas para la replicación y la recuperación del virus introducido, es decir, a 33°C para las Cepas Donantes Maestras adaptadas al frío. El día siguiente (por ejemplo, aproximadamente 19 horas después de la electroporación), se retiró el medio, y se lavaron las células con 3 ml por pocillo de OptiMEM I u OptiPro (SFM). Se añadió un ml por pocillo de OptiMEM u OptiPro (SFM) que contenía pen/estrep a cada pocillo, y se recogieron los sobrenadantes diariamente sustituyendo los medios. Se almacenaron los sobrenadantes a -80°C en SPG. Se observó una producción punta del virus entre 2 y 3 días después de la electroporación.

Por tanto, la presente invención incluye un procedimiento mejorado de rescate, en el que se electroporan células animales (*por ejemplo*, células Vero SF) con polinucleótidos (*por ejemplo*, plásmidos y vectores) de la invención.

TABLA 19

Resultados de 8 rescates de plásmido en cepas MDV para diferentes tipos celulares y diferentes procedimientos de transfección

Sustrato	Procedimiento	Nº de ensayo	Resultado (virus infeccioso recuperado)
MDV-B			
COS-7/MDCK	Lipo	3	positivo
COS-7/MDCK	CaP04	2	positivo
MRC-5	Lipo	5	negativo
MRC-5	CaP04	3	negativo
MRC-5	Electroporación	2	negativo
II-38	Lipo	2	negativo
WI-38	Electroporación	4	negativo
II-38	Microinyección	1	negativo
LF1043	Lipo	1	negativo
LF1043	CaP04	2	negativo
Vero	Lipo	7	negativo
Vero	CaP04	2	negativo
Vero/MDCK	Lipo	1	negativo
Vero (suero)	Electroporación	5	positivo (5/5)
Vero (sin suero)	Electroporación	4	positivo (4/4)
MDV-A			
Vero (suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)
Vero (sin suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)

Ejemplo 10

El cultivo simultáneo de células vero sf electroporadas mejora la eficacia del rescate

Tal como se ha discutido anteriormente, se puede rescatar el virus de la gripe a partir de células vero SF mediante electroporación de las células con plásmidos que codifican cada uno de los ocho segmentos del genoma vírico. Se puede usar este procedimiento para preparar virus 6:2 compuestos por los HA y NA de cepas naturales de la gripe y los PB1, PB2, PA, NP, NS, y M procedentes de una cepa de MDV o PR8. Para algún segmento HA y NA natural, el rescate en células vero SF es ineficaz. En este extremo, se ha encontrado que el cultivo de células vero SF electroporadas con células de Riñón Embrionario de Pollo (CEK) mejoró la eficacia del rescate del plásmido. Por ejemplo, cuando se llevó a cabo la electroporación de células vero SF para rescatar un virus A/Panama 6:2, ninguno de los 30 huevos ensayados (5 huevos/día, días 2-7 después de la electroporación) tuvo títulos HA detectables. Sin embargo, cuando se cultivó una muestra igual de las mismas células vero SF electroporadas con células CEK, 27 de los 30 huevos tuvieron títulos HA detectables (eficacia del 90%) y estos títulos fueron 100 o mejor. Adicionalmente, se observó también esta eficacia mejorada del rescate para MDV A. Adicionalmente, se ha rescatado A/Sendai (otro virus 6:2 que es difícil de rescatar a partir de células vero SF) mediante el procedimiento de cultivo simultáneo.

Por tanto, la presente invención incluye un procedimiento mejorado de rescate, en el que células vero SF electroporadas se cultivan simultáneamente con otra célula seleccionada entre el grupo que incluye, pero no se limita a, células de riñón embrionario de pollo (CEK), fibroblastos embrionarios de pollo, células primarias de riñón de pollo, y células aisladas de la membrana corioalantoica de huevos con embrión de pollo. Otras células útiles para este procedimiento de rescate pueden incluir cualquier células que soporte la replicación del virus de la gripe y cumpla los patrones aceptables para una aprobación de los organismos de regulación las fuentes de células incluyen, por ejemplo, bandadas de pollos procedentes de bandadas de pollos SPF.

En una forma de realización preferida de la invención, se mejora la eficacia del rescate del virus en al menos un 10%, o al menos un 20%, o al menos un 30%, o al menos un 40%, o al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90%, o al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces.

En otra forma de realización preferida de la invención, la eficacia del rescate del virus es al menos del 10%, o al menos del 20%, o al menos del 30%, o al menos del 40%, o al menos del 50%, o al menos del 60% o al menos del 70%, o al menos del 80%, o al menos del 90%, o al menos del 99%. Se puede determinar la eficacia por ejemplo, midiendo cuántos huevos inyectados con los virus rescatados (X) tienen títulos de HA detectables con posterioridad (Y) y dividiendo Y/X.

20 Ejemplo 11

Sistema de vector del virus de la gripe para la administración génica

Se pueden usar también los vectores de la presente invención como sistemas de administración génica y para terapia génica. Para dichas aplicaciones, es deseable generar virus de la gripe recombinantes, por ejemplo, virus de la gripe A o B recombinantes que expresa una proteína extraña. Por ejemplo debido a que el segmento 7 del virus de la gripe B no se corta y empalma, éste proporciona un elemento genético conveniente para la inserción de secuencia heterólogas de ácido nucleico. El ARNm contiene dos cistrones con dos marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas M1 y BM2. El marco de lectura abierto de BN2 o M1 se sustituye por la secuencia heteróloga de interés, por ejemplo, un gen que codifica proteína verde fluorescente potenciada (EGFP). Usando el sistema de vectores basado en plásmidos de la presente invención, el ADNc que codifica el marco de lectura abierto de M1-EGFP y BM2 se clona en dos plásmidos diferentes. El marco de lectura abierto está flanqueado por la región no codificante del segmento 7, que contiene las señales requeridas para la replicación y la transcripción. Alternativamente, se construyen dos plásmidos: uno que contiene el ORF de M1 y el otro que contiene EGFP-BM2. La transfección simultánea de los nueve plásmidos resultantes da como resultado la generación de virus de la gripe B recombinante que contiene la secuencia heteróloga del gen. Similarmente, se puede expresar EGFP a partir del segmento NS 1 de la gripe A.

Se puede usar el virus de la gripe A “verde” a modo de ejemplo para la estandarización en ensayos de virus, tales como los ensayos de microneutralización. La combinación de la tecnología basada en plásmidos y la detección sencilla de la expresión de la proteína (se puede vigilar la fluorescencia derivada de EGFP mediante microscopio, tal como se ilustra en la Figura 2) permite la optimización de la expresión de la proteína.

45 Ejemplo 12

Estudios genéticos de cepas de vacuna de la gripe H3N2 recientes

La cepa A/AA/6/60 de la gripe adaptada al frío, atenuada viva, en las formas de realización preferidas típicas, es el virus donante maestro (MDV-A) para las vacunas FluMist™ de la gripe A. Los 6 genes internos de MDV-a confiere los fenotipos adaptados al frío (*ca*), sensibles a la temperatura (*ts*) y atenuados (*att*) a cada una de las cepas de vacunas. Usando la genética inversa, se demostró que múltiples aminoácidos segregados entre los tres segmentos de genes: PB1-K391E, E581G, A661T, PB2-N265S, y NP-D34G controlan la expresión de los fenotipos *ts* y *att* de MDV-A. El rescate de plásmidos de las cepas de vacuna 6:2 permite una generación más eficaz de vacunas de la gripe que las técnicas de reordenación genómica clásicas.

Las vacunas de la gripe inactivadas para la estación 2003-2004 contenían el antígeno de A/Panama/99 (H3N2) y fueron incapaces de estimular respuestas robustas de anticuerpos en niños seronegativos en las cepas H3N2 del tipo A/Fujian/411/02 derivadas que circularon durante esta estación. Véanse las Figuras 22 y 23. Desafortunadamente, A/Fujian/411/02 no se replica bien en huevos con embrión de pollo, y de esta manera, se prohibió su uso para la fabricación de vacunas. Usando la tecnología de la genética inversa, los inventores demostraron que la pérdida en el equilibrio en las actividades de HA y NA fue responsable de la mala replicación de la cepa A/Fujian/411/02 prototipo en huevos véanse las Figuras 29 a 34. El virus A/Fujian podría obtener su replicación eficaz en huevos tanto aumentando su actividad de HA como reduciendo su actividad de NA. Específicamente, los inventores demostraron que aunque una sustitución sencilla de diversos aminoácidos diferentes era capaz de potenciar ligeramente la replicación de la cepa A/Fujian/411/02 en huevos, algunas combinaciones proporcionan una potenciación más robusta. Véanse las Figuras 35 a 38. Este trabajo ha demostrado la factibilidad de mejorar el crecimiento del virus de la gripe en huevos

con embrión de pollo y/o células huéspedes introduciendo cambio específicos en los genes HA o NA sin afectar la antigenicidad del virus.

Para producir una cepa viable en huevos, se evaluó un conjunto de genomas reordenados 6:2 relacionados con H3N2 del linaje A/Fujian/411/02 para su replicación en células MDCK, huevos con embrión y hurones. Aunque A/Fujian/411/02 no crece en huevos, una adaptación a huevo de este virus dio como resultado dos sustituciones de aminoácidos en HA, H183L y V226A que permitió el crecimiento del virus en huevos con embrión. Adicionalmente, los inventores compararon una cepa A/Wyoming/03/2003 adaptada a huevo que crecía bien en huevos y hurones y la vacuna de A/Sendai/H-F4962/02 que crecía bien en huevos, pero se replicaba mal en hurones en términos de la secuencia. Los inventores determinaron que G186V y V226I en HA, y/o Q119E y K136Q en NA requerían una replicación eficaz del virus *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, estos cambios de aminoácidos no tuvieron efecto sobre la antigenicidad del virus. Se contempla y espera la adopción de dichas técnicas para producir cepas capaces de crecer en huevos (para cepas que son difíciles/problemáticas de crecer en huevos) o para producir cepas más capaces de crecer en huevos (para cepas que pueden crecer ya en huevos) para otros virus de la gripe.

Se estudió la base molecular par la deriva antigénica de las cepas del tipo A/Panama/99 y A/Fujian/02 cambiando los grupos de restos de HA de A/Panama/99 por los de A/Wyoming/03. Véase la Figura 24. Se examinó la antigenicidad de los genomas reordenados 6:2 modificados mediante ensayos de HAI y microneutralización usando sueros de hurón de animales inmunizados tanto con A/Panama/99 como con A/Wyoming/03. Véanse las Figuras 25 a 28. Se determinó que únicamente unos pocos cambios eran responsables de la deriva antigénica mientras que otros tuvieron un impacto más drástico sobre la replicación del virus. De esta manera, tal como se indicó mediante los datos, se usó opcionalmente la genética inversa para modificar las cepas de vacunas para aumentar los rendimientos de la vacunas sin afectar la antigenicidad del virus.

Materiales y procedimientos

Cepas de virus, células y anticuerpos: Se obtuvieron las cepas de virus de la gripe A naturales (wt), A/Fujian/411/02 (A/Fujian), A/Sendai-H/F4962/02 (A/Sendai) y A/Wyoming/03/03 (A/Wyoming), del Centro para el Control de Enfermedades (Atlanta, GA) y se amplificaron una vez en células MDCK o en huevos con embrión de pollo (huevos). Se hicieron crecer los virus modificados de la vacuna de la cepa Ankara que expresaban la ARN polimerasa T7 (MV A-77) en células CEK. Se mantuvieron células HEp-2, COS-7, y MDCK (obtenidas de la American Type Culture Collections, ATCC) en medio esencial mínimo (MEM) que contenía suero bovino fetal al 5% (FBS). Se produjeron antisueros policlonales frente a A/Ann Arbor/6/60, A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/03 en pollos. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a la proteína NP de la gripe A de BioDesign (Saco, MI).

Generación de genomas reordenados 6:2 recombinantes: Se generaron genomas reordenados 6:2 recombinantes que contenían segmentos de ARN de HA y NA de las cepas H3N2 reordenadas genómicamente en MDV-A, de acuerdo con los procedimientos anteriormente descritos. De manera breve, se transfectó un conjunto de seis plásmidos que contenía los genes internos de MDV-A junto con los plásmidos de expresión de HA y NA en células COS-7/MDCK cultivadas simultáneamente usando reactivos TransIT LT1 (Mirus, Madison, WI). Se recogió el sobrenadante del cultivo celular transfectado a los 3 días después de la transfección y se usó para infectar células MDCK recientes y huevos con embrión de pollo de 10 días. Se incubaron las células MDCK infectadas a 33°C hasta que el 80-90% de las células presentaron efecto citopático. Se incubaron los huevos con embrión de pollo infectados a 33°C durante tres días y se recogieron los fluidos alantoicos y se almacenaron a -80°C en presencia de estabilizador SPG (sacarosa 0,2 M, KH₂PO₄ 3,8 mM, K₂HPO₄ 7,2 mM, glutamato monosódico 5,4 mM). Se determinó el título del virus mediante el ensayo de placas en células MDCK incubadas bajo una cubierta que estaba constituida por 1xL15/MEM, agarosa al 1% y 1 µg/ml de TPCK-tripsina a 33°C durante 3 días. Se enumeraron las placas mediante inmunotinción usando anticuerpos policlonales de MDV-A contra pollo.

Clonación de plásmidos de expresión de HA y NA: Para preparar virus de genoma reordenado 6:2 recombinantes que contengan los segmentos HA y NA del subtipo H3N2 y los seis segmentos internos de ARN de MDV-A, se amplificaron los ADNc de HA y NA de A/Sendai-H/F4962/02 natural y A/Wyoming/03/03 mediante la PCR-RT usando la transcriptasa inversa SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la ADN polimerasa de la ufp (Stratagene, La Jolla, CA), el ARNv extraído como plantilla y los cebadores específicos de H3 y N2. Se usaron los cebadores HA-Aar15 (5'-cacttatattcacctgcctcaggagcaaaagcagggtt3') y HA-AarL3 (5'-cctaataatcacctgcctcgtattagtagaacaagggtt3') para amplificar el segmento HA. Se usaron los cebadores (5'-cattatattcacctcaggagcaaaagcaggagt3') y N2-AarL3 (5'-cc-taataatcacctgcctcgtattagtagaacaaggagt3') para amplificar el segmento NA. Las parejas de cebadores de HA y NA contenían los emplazamientos de restricción Aar I que se diseñaron por ser comparables con los emplazamientos BsmB presentes en el plásmido de expresión pAD3000 pol I/pol II. Se secuenciaron los clones de ADNc de HA y NA y se compararon con las secuencias consenso de HA y NA que se obtuvieron mediante secuenciación directa de los productos del ADNc amplificados mediante la PCR-RT de HA y NA. Se corrigió cualquier mutación introducida en los clones de ADNc durante el proceso mediante el kit QuickChange de mutagénesis dirigida al emplazamiento (Stratagene, La Jolla, CA).

Ensayo HAI (Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación del Virus de la Gripe): Reactivos: cRBC al 0,5% (lavados tres veces con PBS, se puede usar en 2-3 días; microplaca de fondo en U de 96 pocillos; PBS (sin Ca y Mg); Pistas; virus de la gripe; muestras de suero y suero control positivo de título elevado y bajo Preparaciones: Título de HA del

virus con Detenina mediante el ensayo de HA (Uso del título del virus a 1:8 par HAI. Si el título de HA de un virus dado es 1:256, dividir éste por 8. De esta manera, se necesita diluir el virus 1:32. Preparar 2,5 ml de virus para cada placa de 96 pocillos); Tratar el suero con RDE (enzima que destruye el receptor) opcional para muestras de hurones; Preparar el RDE como enseña el fabricante; Combinar el RDE y la muestra de suero a una dilución 1:4. Por ejemplo, añadir 100 μ l de suero y 300 μ l de RDE. Someter a vortización la mezcla e incubar durante la noche (18-20 h) en estufa a 37°C. Calentar la mezcla a 56°C durante 45-50 min. Cribar el suero para las aglutininas no específicas; Mezclar 25 μ l de suero tratado con RDE con 25 μ l de PBS- pipeteando arriba y abajo 3 x; Añadir 50 μ l de cRBC al 0,5% a la mezcla y controlar bien únicamente con PBS-, Incubar a RT durante 30-45 min (+: indica hemaglutinación no específica parcial o completa -: indica sin hemaglutinación); Se pueden eliminar las aglutininas de cRBC no específicas mediante preincubación del suero con RBC empaquetado a una relación 20:1 a 4°C durante 1 h, seguido por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a 4°C). Los controles pueden incluir normalmente lo siguiente: control de células con cRBC; Se vuelve a valorar el virus; una dilución de 2 veces de 8 unidades/50 μ l de virus diluido desde 1:2 a 1:32 para tener la seguridad de que el virus usado está a las concentraciones correctas; Control positivo del suero: diluir 2 veces en serie suero de título conocido junto con la muestras de suero de ensayo. Un protocolo HAI típico puede comprender Diluir muestras de suero dos veces en serie; Añadir 25 μ l de PBS- a cada pocillo; Añadir 25 μ l de virus al pocillo 1A (por ejemplo, 1:2), mezclar mediante pipeteado arriba y abajo 3 x; Transferir 25 μ l desde el pocillo A al pocillo B (por ejemplo, 1:4) y mezclar como anteriormente 3x, repetir la dilución hasta el pocillo H (por ejemplo, 1:256); Añadir 25 μ l de virus (8 unidades/50 μ l) par muestras de suero diluidas, mezclar arriba y bajo 3x e incubar a RT durante 30-40 min; Añadir 50 μ l de cRBC al 0,5%, mezclar bien pipeteando arriba y abajo 3x; Incubar a RT durante 30-45 min; Registrar la hemaglutinación. Se define el título de HAI como la mayor dilución del suero que inhibe completamente la hemaglutinación. Si no se observa inhibición, el título es < 1:4. Si todos los pocillos muestran inhibición, el título es > 1:256.

Medida de la actividad de la neuraminidasa de la proteína NA expresada transitoriamente: Para medir la actividad de la neuraminidasa de las proteínas NA, se expresaron Na natural y sus derivado modificados a partir de las células transfectadas con plásmidos. Para obtener un elevado nivel de expresión de las proteínas NA, se transcribió el ARN de NA a partir de los promotores de T7 y CMV en los que se insertó el gen en la dirección 3' de estos promotores dobles. Se infectaron células Hep-2 en placas de 10 cm con MVA-T7 a una moi de 5,0 durante 1 h seguido por la transfección de 5 μ g del plásmido de NA usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se incubaron la células transfectadas a 35°C durante 48 h. Tras lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se rascaron las células de las placas y se lisaron en 100 μ l de NaOH 0,125 M, pH 5,0. Se determinó la actividad de la neuraminidasa en las células transfectadas mediante un ensayo fluorimétrico. Tras un periodo de congelación-descongelación, se diluyeron en serie dos veces 50 μ l de lisados celulares y se incubaron con 150 μ l de sustrato de Ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (MU-NANA) (Sigma, St Louis, MO) a 37°C durante 1 h y se detuvieron mediante 75 μ l de Glicina 1,0 M (pH 5,5). Se determinó el nivel de fluorescencia del cromóforo 4-metilumbeliferona liberado a 362 nm en un lector de placas Spectro-MAX. Se vigiló el nivel de cada proteína NA expresada en las células transfectadas mediante transferencia Western usando antisueros de A/Wyoming dirigidos contra pollo. Se midieron también mediante el ensayo fluorimétrico las actividades de la neuraminidasa de los virus A/Sendai y A/Wyoming naturales que contenían log₁₀ UFP en 100 μ l.

Unión al receptor y replicación de los recombinantes 6:2 en células MDCK: Se determinó la unión al receptor y la cinética del crecimiento de los genomas reordenados 6:2 recombinantes en células MDCK. Se infectaron células MDCK en placas de 6 pocillos con A/Fujian, A/Sendai, A/Wyoming 6:2 y dos virus recombinantes modificados a una moi de 1,0. Después de 30 min de adsorción a cualquiera de 33°C o 4°C, las células infectadas se lavaron tres veces tanto con PBS, como se cubrieron directamente con 3 ml de OptiMEM I que contenía 1 μ g/ml de TPCK-Tripsina, y se incubaron a 33°C. Se fijó un conjunto de placas infectadas con paraformaldehído al 1% a las 6 h después de la infección durante 15 min a temperatura ambiente, y se permeabilizó con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 15 min seguido por el análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales contra NP. Se analizaron imágenes celulares capturadas por una cámara digital ORCA-100 mediante software de captura de imágenes y análisis de intensidad dinámica Compix, versión 5.3 (Cranberry Township, PA) para calcular el porcentaje de células infectadas. Se incubó otro conjunto de placas a 33°C. En diferentes intervalos de tiempo, se recogieron 250 μ l de sobrenadante del cultivo y se almacenaron a -80°C en presencia de SPG antes de la valoración del virus. Después se retiró cada alícuota, se añadió una cantidad igual de medio reciente a las células. Se determinó el título del virus en estas alícuotas mediante el ensayo de placas en células MDCK a 33°C.

Para determinar si la diferencia en la unión entre estos virus afectó a la cinética de crecimiento del virus en células MDCK, se incubaron las células MDCK infectadas a 33°C y se recogieron los sobrenadantes del cultivo en diversos momentos para la valoración del virus. Cuando se adsorbió a 33°C, A/Fujian 6:2 tuvo una menor cinética de crecimiento y un título inferior (Fig. 2), A/Sendai, A/Fujian 6:2 con HA-V186I226 o HA-L183A226 se comportaron similarmente a A/Wyoming 6:2. Cuando se llevó a cabo la adsorción a 4°C, A/Fujian así como 6:2 así como A/Sendai 6:2 tuvieron menores cinéticas de crecimiento. A/Wyoming 6:2 y las dos variantes de A/Fujian crecieron similarmente. Estos resultados fueron consistentes con el ensayo de unión al virus mientras que la etapa de lavado redujo eficazmente la infección de A/Fujian a ambas temperaturas.

Antigenicidad de virus recombinantes 6:2: Se analizó la antigenicidad de cada virus mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HAI) usando sueros de A/Sendai y A/Wyoming dirigidos contra hurón. Se incubaron 25 μ l de antisueros de hurón diluidos en serie 2 veces con 25 μ l de virus que contenía 4 unidades de HA de virus de

ES 2 345 492 T3

genoma reordenado 6:2 a 37°C durante 1 h seguido por incubación con 50 µl de glóbulos rojos de pavo al 0,5% (RBC) a 25°C durante 45 min. Se definió el título de HA como el recíproco de la mayor dilución de suero que inhibió la hemaglutinación.

Generación de cepas de vacunas de A/Fujian, A/Sendai, y A/Wyoming 6:2

Se obtuvieron las cepas de virus de la gripe A naturales (wt), A/Fujian/411/02, A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/02 del Centro para el Control de las Enfermedades (Atlanta, GA) y se amplificaron una vez en células MDCK o en huevos con embrión de pollo. Tal como se indica en la Tabla 20. Tal como se indica en la Tabla 20, se pasó únicamente A/Fujian tres veces en cultivo celular, mientras que A/Sendai y A/Wyoming lo hicieron en 11 pasos en huevos. Se determinaron las secuencias de HA y NA de esta tres cepas mediante secuenciación de los productos de la PCR-RT usando ARNv extraído de estos virus. En la Tabla 1 se relacionan las diferencias en la secuencia de HA y NA de estas tres cepas H3N2 A/Sendai fue idéntica a A/Fujian en su secuencia de aminoácidos HA1 pero difirió en la secuencia de NA en tres aminoácidos en las posiciones 119, 146 y 347. A/Wyoming tuvo la secuencia de NA idéntica a la de A/Fujian, pero difirió de A/Fujian y A/Sendai en HA1 en cuatro aminoácidos. Adicionalmente, A/Sendai y A/Wyoming tenían Glu-150 en vez de Gly-150 en HA2. Después de una amplificación de una vez en células MDCK, el resto 183 en HA1 de A/Fujian natural mutado entre His-183 y Leu-183 y fue difícil aislar el virus A/Fujian natural con His-183, indicando que el virus con His-183 crece con ventaja *in vitro*.

Estos tres virus naturales crecieron diferentemente en células MDCK, alcanzando títulos de 6,1, 8,1 y 6,7 log₁₀ UFP/ml para A/Fujian natural, A/Sendai natural y A/Wyoming natural, respectivamente. A/Fujian natural se replicó mal en huevos, alcanzando un título de 4,1 log₁₀ UFP/ml (Tabla 20). El virus aislado de huevos tenía el cambio H183L en HA. En contraste, A/Sendai natural y A/Wyoming natural crecieron bien en huevos que tenían títulos de 9,0 y 8,9 log₁₀ UFP/ml, respectivamente.

Para confirmar que los segmentos de HA y NA de estas cepas H3N2 controlaron la replicación del virus en huevos y células, se reordenaron genómicamente los segmento de los genes HA y NA con los segmentos génicos internos de la cepa A/Ann Arbor/6/60 adaptada al frío, el virus donante maestro de las vacunas FluMist de la gripe atenuadas vivas (MDV-A) para generar tres virus de genoma reordenado 6:2. Se evaluó la replicación de estos tres virus en células MDCK y huevos con embrión de pollo A/Fujian 6:2 (6,2 log₁₀ UFP/ml) mostró un título menor que A/Sendai 6:2 (7,1 log₁₀ UFP/ml) y A/Wyoming (7,0 log₁₀ UFP/ml) en células MDCK. Similar a A/Fujian natural, A/Fujian 6:2 se replicó mal en huevos con embrión de pollo con un título de 4,1 log₁₀ UFP/ml. A/Sendai y A/Wyoming 6:2 se replicaron a títulos mayores de 8,7 y 8,1 log₁₀ UFP/ml, respectivamente. De esta manera, la transferencia de los segmentos de los genes HA y NA naturales en MDV-A no cambia la capacidad de cada virus para replicarse en huevos.

TABLA 20

Comparación entre cepas tipo natural y recombinante 6:2 de A/Fujian/411/02 en la secuencia de HA y NA y su replicación en células MDCK y huevos

Cepas de virus	Posiciones de aminoácidos							
	HA1				HA2		NA	
	128	186	219	226	150	119	136	347
A/Fujian/411/02 ⁽¹⁾ (C1/C2)	T	G	S	V	G	E	Q	H
A/Sendai-H/F4962/02 (Cx8/E3)	-	-	-	-	E	Q	K	Y
A/Wyoming/03/03 (ck2E2/E9)	A	V	Y/F	E	-	-	-	-

ES 2 345 492 T3

Cepas de virus (Historial de paso)	Título de virus (\log_{10} UFP/ml \pm SE) ⁽³⁾			
	MDCK		Huevos	
	Tipo natural	6:2	Tipo natural	6:2
A/Fujian/411/02 ⁽¹⁾ (C1/C2)	6,1 \pm 0,3	6,2 \pm 0,3 ⁽²⁾	4,1 \pm 0,6	4,2 \pm 0,5
A/Sendai-H/F4962/02 (CxE8/E3)	8,1 \pm 0,2	7,1 \pm 0,1	9,0 \pm 0,3	8,7 \pm 0,2
A/Wyoming/03/03 (ck2E2/E9)	6,7 \pm 0,5	7,0 \pm 0,4	8,9 \pm 0,3	8,1 \pm 0,1
⁽¹⁾ A/Fujian de tipo natural tiene el cambio H183L tras paso de un tiempo por células MDCK y huevos ⁽²⁾ A/Fujian 6:2 recombinante contenido en E150 de HA2. ⁽³⁾ Títulos de virus expresados como procedió de \log_{10} UFP/ml \pm SE a partir de dos o más muestras				

Efecto de los cambios de aminoácidos en las actividades neuraminidasa en NA y en la replicación del virus

A/Fujian difirió de A/Sendai en tres aminoácidos en NA, E119Q, Q136K y H347Y (Tabla 20), se argumentó que uno o más de estos cambios permitió a A/Sendai replicarse en huevos con embrión de pollo a un título mayor que A/Fujian. Se ha informado de sustituciones de E119 en restos G, D, A o V para diversas cepas resistentes a fármacos anti-neuraminidasa que dieron como resultado actividad neuraminidasa reducida. Para determinar si E119Q o cualquiera de los otros dos cambios en NA tuvieron un efecto sobre la actividad de NA de A/Fujian y sobre su capacidad de replicarse en huevos con embrión de pollo, se introdujeron mutaciones únicas y dobles en los plásmidos de expresión de NA de A/Fujian y se midió la actividad de NA en células HEP-2 transfectadas. Adicionalmente, se recuperaron también los virus recombinantes 6:2 recombinantes que soportaban mutaciones en NA de A/Fujian y se comparó su crecimiento en células MDCK y huevos (Tabla 21). A/Fujian (E119Q136H147) tuvo una actividad de NA aproximadamente 80% mayor en comparación con la de A/Sendai (Q119K136Y147). La mutación única en Q119 tuvo una actividad de NA del 66%, el cambio en Y347 tuvo un mínimo efecto sobre la actividad de NA pero K136 tuvo únicamente una actividad del 25%. Las mutaciones dobles, K136Y347, Q119Y347, y Q119K136 tuvieron actividad de NA reducida a niveles del 29%, 52% y 25% de A/Fujian, respectivamente. Estos datos indicaron que estos tres restos de NA afectaron la actividad de NA en el orden de K136 > Q119 > Y347.

Se examinó la correlación de la actividad de NA de los mutantes de NA con la replicación del virus en huevos con embrión de pollo (Tabla 21). Los seis virus modificados mostraron replicarse bien en células MDCK alcanzando títulos que oscilaban entre 6,2 y 6,9 \log_{10} UFP/ml, pero se replicaron de manera significativamente diferente en huevos. FJ-Q119 y FL-347 que tenían un 66% y un 99% de actividad de NA de A/Fujian fueron incapaces de crecer en huevos. FJ-K136 con una actividad de NA del 25% fue capaz de crecer a un título de 4,8 \log_{10} UFP/ml en huevos, pero 4,0 \log_{10} fue inferior que el de A/Sendai (8,8 \log_{10} UFP/ml). Inesperadamente, aunque K136Y347 disminuyó significativamente la actividad de NA *in vitro*, el virus recombinante que transporta estas dos mutaciones (FJ-K136Y347) no fue capaz de replicarse en huevos con embrión de pollo. Q119Y347 que tuvo una actividad de NA del 52% se replicó en huevos a un título de 4,5 \log_{10} ufp/ml. Q119K136 que tuvo la actividad de NA ligeramente mayor que la de A/Sendai se replicó a un título de 6,2 \log_{10} ufp/ml pero fue todavía 2,6 \log_{10} inferior que A/Sendai. Estos resultados indicaron que cada uno de los tres restos de NA difirió entre A/Fujian y A/Sendai afectó a la replicación del virus de manera diferente. Aunque algunas mutaciones de NA podrían reducir la actividad de NA al nivel cercano a la de A/Sendai, únicamente los cambios en Q136K y E119 podrían dar como resultado una mejora significativa en la replicación del virus en huevos con embrión de pollo. Debido a que las mutaciones dobles Q119K136 no se replican tan eficazmente como los virus A/Sendai en huevos, el resto Y347 puede afectar también la replicación del virus en huevos.

ES 2 345 492 T3

TABLA 21

Efectos de los restos de NA sobre la replicación vírica en células MDCK y huevos con embrión

NA	Restos de NA			actividad de NA ⁽¹⁾ (Promedio ± SE)	Título de virus ⁽²⁾ (Log ₁₀ UFP/ml)	
	119	136	347		MDCK	Huevos
A/Fujian	E	Q	H	100	6,5	< 1,5
FJ-Q119	Q	-	-	66 ± 3	6,7	< 1,5
FJ-Y347	-	-	Y	99 ± 1	6,6	< 1,5
FJ-K136	-	K	-	25 ± 1	6,6	4,8
FJ-K136Y347	-	K	Y	29 ± 3	6,5	< 1,5
FJ-Q19Y347	Q	-	Y	52 ± 4	6,6	4,5
FJ-Q119K136	Q	K	-	25 ± 1	6,2	6,2
A/SENDAI	Q	K	Y	21 ± 1	6,9	8,8

⁽¹⁾ Las actividades de NA en células HEp-2 transfectadas con ADNc de NA se expresan como porcentaje de A/Fujian (promedio ± error estándar) a partir de cuatro experimentos independientes

⁽²⁾ Los virus recombinantes 6:2 se generaron usando A/Fujian HA y NA o A/Fujian NA con las mutaciones indicadas

Efectos de los restos en la replicación del virus

Se investigaron los cambios de los cuatro restos HA1 en A/Wyoming/03/03 que difirieron de A/Fujian por sus papeles en la replicación del virus. Se introdujeron mutaciones con sustituciones única y múltiples en el ADNc de HA de A/Fujian y se introdujeron los plásmidos de HA modificados en MDV-A junto con cualquier NA de A/Fujian todos los mutantes de los virus de genoma reordenado 6:2 se replicaron bien en células MDCK pero crecieron diferentemente en huevos con embrión de pollo (Tabla 33). Los genomas reordenados 6:2 con HA de A/Fujian (T128G186S219V226) fueron incapaces de replicarse en huevos. Un cambio único T128A no mejora el crecimiento del virus en huevos. Sin embargo el cambio G186V o V226I único dio como resultado un aumento en la replicación del virus en huevos. Los cambios G186V y V226I dobles en HA se replicaron eficazmente en huevos. Las sustituciones adicionales en los restos 128 y/o 219 no aumentan significativamente la replicación del virus. De esta manera, un mínimo de dos cambios G186V y v226I permitieron crecer eficazmente A/Fujian 6:2 en huevos con embrión de pollo.

TABLA 22

Efectos de los restos de HA sobre la replicación del virus en huevos embrionados

Virus (I)	Restos de HA				Título de virus en huevos ⁽²⁾ (log ₁₀ UFP/ml)
	128	186	219	226	
A/Fujian	T	G	S	V	< 1,5
HA-AI28	A	-	-	-	< 1,5
HA-VI86	-	V	-	-	4,9
HA-I226	-	-	-	I	5,2
HA-VI86I226	-	V	-	I	7,6
HA-VI86Y219I226	-	V	Y	I	7,5
A/Wyoming	A	V	Y	I	7,3

⁽¹⁾ Virus recuperado de las células transfectadas que contenían A/Fujian NA y HA con los cambios indicados en los aminoácidos

Adaptación de A/Fujian/411/02 6:2

Para determinar si la cepa A/Fujian 6:2 podría adaptarse a crecer en huevos con embrión de pollo, se amplificó el virus en células MDCK seguido por el paso en huevos (Tabla 23). Cuando se inoculó 3,0 log₁₀ UFP de virus en un huevo, se detectó menos de 2,0 log₁₀ UFP de virus en el fluido alantoico cosechado. El virus infeccioso podría no recuperarse tras los pasos de este material. Durante el paso del segundo experimento, la cantidad de virus inoculado en huevos con embrión de pollo creció a 5,9 log₁₀ UFP. Se detectó un título de 3,9 log₁₀ UFP en el fluido alantoico cosechado (FJ-EP1) y un paso adicional en huevos aumentó el título del virus a 6,2 log₁₀ UFP/ml (FJ-EP2). Un paso adicional en huevos (FL-EP3) aumentó el título del virus a 8,2 log₁₀ UFP/ml. El análisis de la secuencia del virus FJ-EP2 desveló una mutación de A a U en el nt 625 en el segmento del ARN de HA que dio como resultado un cambio H183L en la proteína HA. El análisis adicional mostró que este cambio se produjo también durante la amplificación del virus en células MDCK. Se encontró también la mutación H183L en HA de A/Fujian natural durante su replicación en MDCK y huevos, tal como se ha descrito anteriormente. Se encontró una mutación de U a C adicional en el nt 754 de HA dando como resultado una sustitución en V226A en el virus FJ-EP3 amplificado (Tabla 23). No se detectaron cambios en el segmento NA.

Para confirmar que las mutaciones H183L y V226A en HA fueron por tanto responsables del aumento de la replicación de A/Fujian 6:2 en huevos, se introdujeron H183L y V226A en HA de A/Fujian únicamente o en combinación. Se obtuvieron tres virus recombinantes y crecieron hasta un título de 7,4 log₁₀ UFP/ml para FJ-H183L, 7,9 log₁₀ UFP/ml para FJ-V226A y 8,4 log₁₀ UFP/ml para FJ-H183L/V226A (Tabla 23). Por tanto, H183L y V226A contribuyeron independientemente a la mejora en la replicación del virus A/Fujian en huevos con embrión de pollo.

TABLA 23

Mutaciones en el HA de los revertientes A/Fujian 6:2 adaptados a huevo y su replicación en huevos con embrión

Virus	Mutaciones en el nucleótido (aminoácido)	Títulos de virus ⁽²⁾ (Log ₁₀ UFP/ml)
Pasados a huevos		
FJ-EP 1	ND ¹	3,9
FJ-EP2	A625U (H183L)	6,2
FJ-EP3	A625U (H183L), U745C (V226A)	8,2
Recombinantes		
FJ-183L	A625T (H183L)	7,4
FJ-226A	T745C (V226A)	7,9
FJ-183L/226A	A625U (H183L), U745C (V226A)	8,4
¹ No determinado		

Propiedades de unión al receptor y replicación de virus recombinantes

Con respecto a los anteriores estudios, los cambios en NA que redujeron la actividad de NA de A/Fujian mostraron ser suficientes para hacer crecer este virus en huevos. Por otra parte los cambios en HA (G186V y V226I o H183L y V226A) pueden haber aumentado la afinidad de unión al receptor para compensar la mayor actividad de NA de A/Fujian. Para determinar si los cambios en la proteína HA de A/Fujian aumentaron su capacidad de unión al receptor, se compararon la adsorción de A/Fujian 6:2 que transportaba el cambio V186I226 en HA y A/Fujian 6:2 adaptado a huevo que contenía los cambios HA-L183A226 con A/Fujian, A/Sendai, y A/Wyoming 6:2. Se adsorbió cada virus sobre células MDCK a una moi de 1,0 durante 30 min a 4°C o 33°C, se retiró el inóculo y se lavaron las células infectadas tres veces o sin la etapa de lavado. Después de 6 h de incubación a 33°C, se determinó el porcentaje de células infectadas mediante el análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpo contra NP. Tal como se muestra en la Fig. 36, A/Fujian y A/Sendai 6:2 infectaron 26-27% de células cuando se llevó a cabo la adsorción a 4°C, pero la mayoría de los virus se eliminaron fácilmente mediante la etapa de lavado. A 33°C, el lavado redujo mucho la infección de virus A/Fujian 6:2 (6,2% en comparación con 37,8%) pero no tiene efecto significativo sobre la infección de A/Sendai 6:2 (42,8% en comparación con 51,7%). En contraste, A/Wyoming, A/Fujian 6:2 con HA-V186I226 o HA-L183A226 no tiene importancia que tuviera una tasa de infectividad similar si se adsorbieron las células a 4°C o 33°C y con o sin etapa de lavado. Estos datos indicaron que HA de A/Fujian y A/Sendai tenía tan baja afinidad de unión que los virus unidos a 4°C podrían eliminarse fácilmente por lavado de las células. La unión y la cinética de entrada del virus fueron más rápidas a 33°C, de esta manera, la etapa de lavado tuvo un mínimo impacto en la infección por virus A/Sendai 6:2. Sin embargo, la mayoría de A/Fujian 6:2 unido se eliminó mediante lavado en condiciones similares debido a que su mayor actividad de NA evitó la unión eficaz del virus a 33°C (no se muestran los datos).

Antigenicidad de virus recombinantes

Para examinar si los virus con los restos HA y NA modificados afectaron la antigenicidad del virus, se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) usando sueros de A/Wyoming y A/Sendai dirigidos contra hurón (Tabla 24). Los sueros de A/Wyoming y A/Sendai dirigidos contra hurón tuvieron un título de HAI similar cuando se midieron con virus tanto de A/Fujian como de A/Sendai 6:2. Se detectó un título de HAI ligeramente mayor con el virus A/Wyoming 6:2, debido probablemente a la estrecha unión de HA de A/Wyoming con el receptor celular de los glóbulos rojos. Los dos virus modificados A/Fujian HA-V186I226 y A/Fujian HA-L183A226) tuvieron un título de HAI similar al de A/Wyoming cuando se midieron en cualquier suero. Estos resultados indicaron que la diferencia de aminoácidos entre los virus A/Sendai y A/Wyoming y HA modificado generados en este estudio no alteran la antigenicidad del virus.

TABLA 24

Antigenicidad de los virus A/Fujian 6:2 modificados

Virus ⁽¹⁾	HA					NA			Antigenicidad (log ₂ HAI) ⁽²⁾	
	128	183	186	219	226	119	136	347	anti-A/WY	anti-A/SD
A/Fujian	T	H	G	S	V	E	Q	H	9	9
A/Wyoming A	-	V	Y	I	-	-	-	-	11	10
HA-V186I226	-	-	V	-	I	-	-	Y	11	11
HA-L183A226	-	L	-	-	A	-	-	-	11	11

⁽¹⁾ A/Fujian se hizo crecer en células MDCK y el resto de virus se hicieron crecer en huevos

⁽²⁾ Se midió la antigenicidad mediante el ensayo HAI usando suero de hurón inmunizado contra A/Wyoming (suero contra A/WY) o A/Sendai (suero contra A/SD) con los antígenos víricos indicados

Aunque se ha descrito la invención anterior en algún detalle a objeto de claridad y comprensión, estará claro para una persona experta en la técnica a partir de una lectura de esta divulgación que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden usar todas las técnicas y equipos descritos anteriormente en diversas combinaciones. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patentes, u otros documentos que se indicaron individualmente se van a incorporar por referencia a todos los efectos.

En particular, se incorporan por referencia en su totalidad las siguientes solicitudes de patentes: Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos números 60/574.117, presentada el 24 de mayo de 2004; 60/578.962, presentada el 12 de junio de 2004; 60/532.164, presentada el 23 de diciembre de 2003, Solicitud PCT N° US03/12728, presentada el 25 de abril de 2003; y solicitud de los Estados Unidos N° 10/423.828, presentada el 25 de abril de 2003.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de rescate de un virus de la gripe recombinante, comprendiendo el procedimiento:

- (i) electroporar células Vero con vectores de polinucleótidos que dirigen la expresión en dichas células Vero de segmentos de ARNv genómicos o antigenómicos, y una nucleoproteína, y una polimerasa dependiente de ARN, de tal manera que se puedan formar complejos de ribonucleoproteínas y se puedan ensamblar partículas víricas en ausencia del virus auxiliar;
- (ii) cultivar simultáneamente las células Vero electroporadas con otro tipo de células en condiciones que permiten la replicación vírica; y
- (iii) recuperar el virus de la gripe,

en el que la eficacia del rescate es al menos del 90%.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células Vero son células Vero SF.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos otros tipos de células son células CEK.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe es un virus de la gripe A.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe es un virus de la gripe B.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe es un virus adaptado al frío.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe es un virus atenuado.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los vectores son un conjunto de plásmidos y en el que el número de plásmidos diferentes en el conjunto de plásmidos es ocho.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los vectores son un conjunto de plásmidos y en el que el número de plásmidos diferentes en el conjunto de plásmidos es doce.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los vectores dirigen la expresión de al menos un segmento de ARNv derivado de A/PR/8/34.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los vectores dirigen la expresión de al menos un segmento de ARNv derivado de MDV-A.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los vectores dirigen la expresión de al menos un segmento de ARNv derivado de MDV-B.

13. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos otros tipos de células son células MDCK.

14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el MDV-A es A/Ann Arbor/6/60.

15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el MDV-B es B/Ann Arbor/1/66.

pAD3000

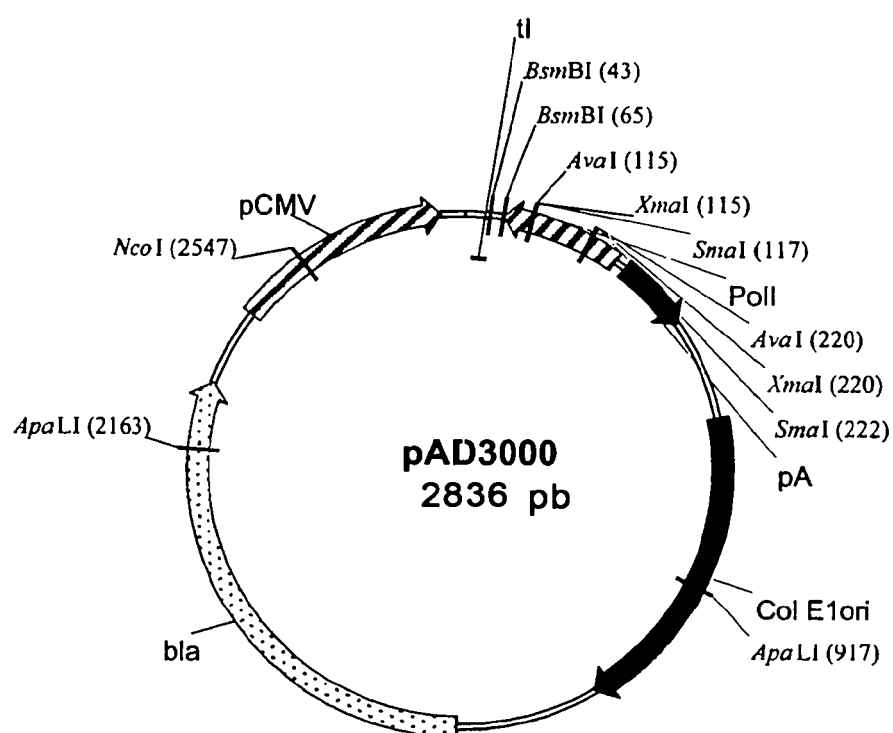


Fig. 1

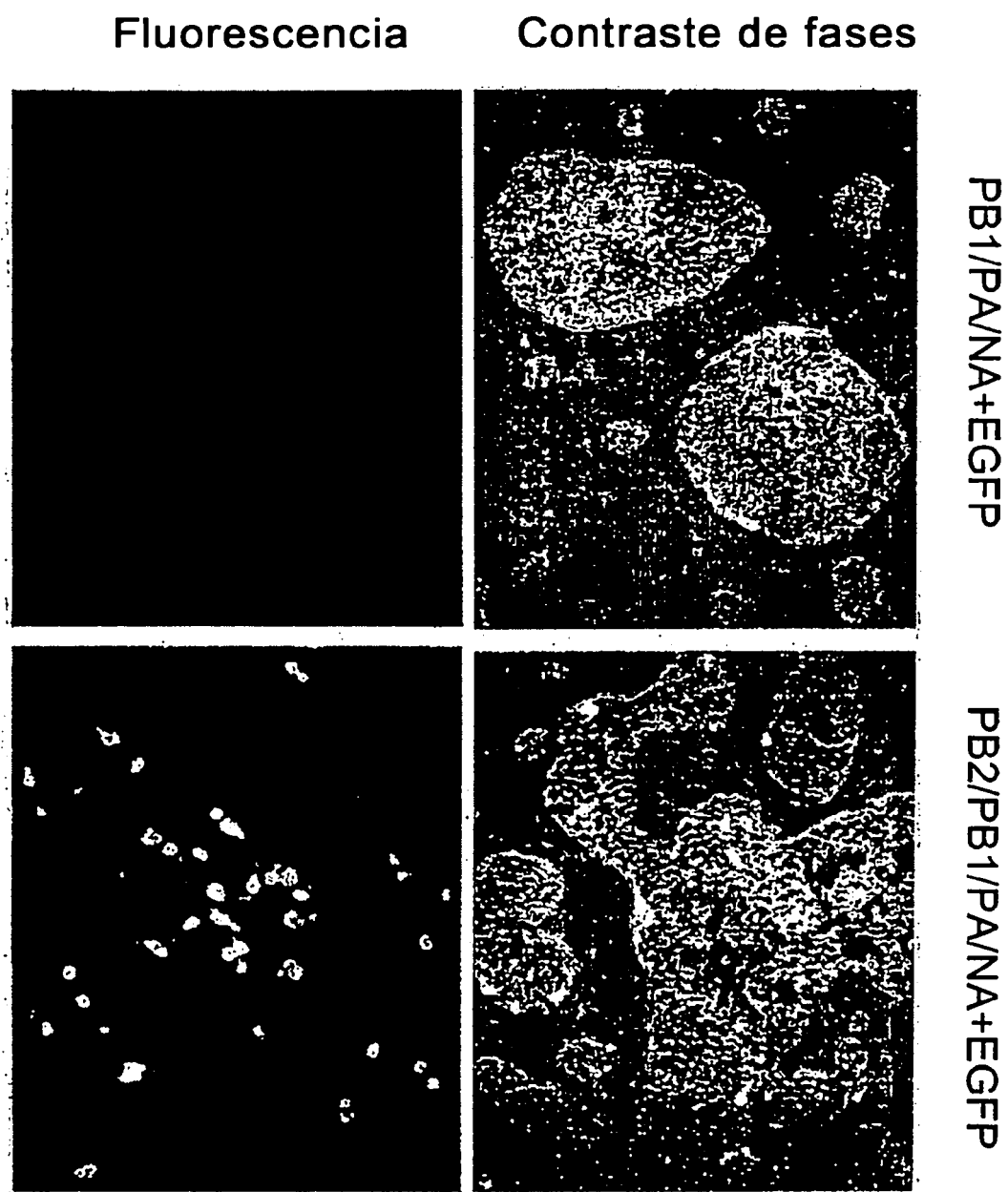


Fig. 2

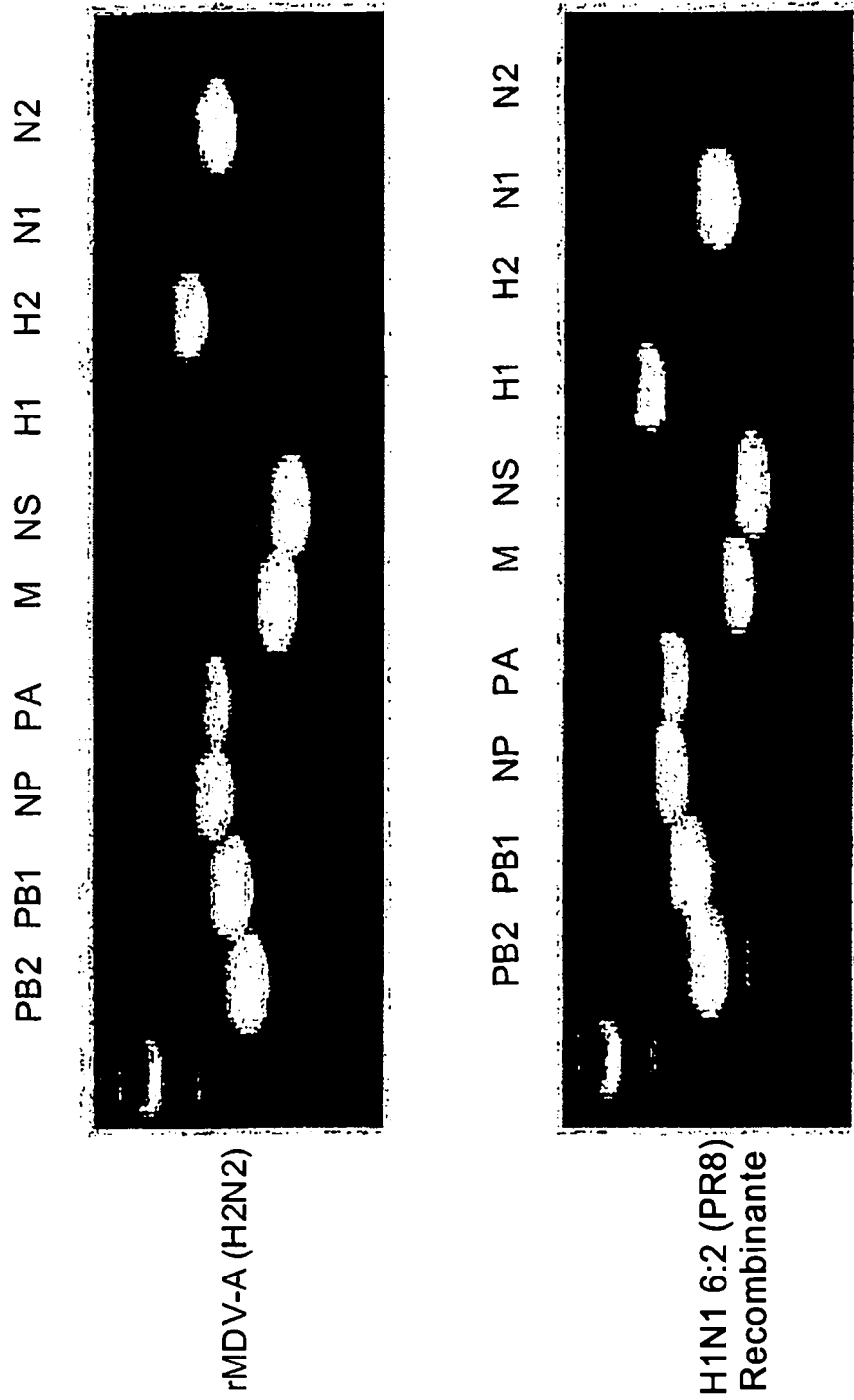


Fig. 3

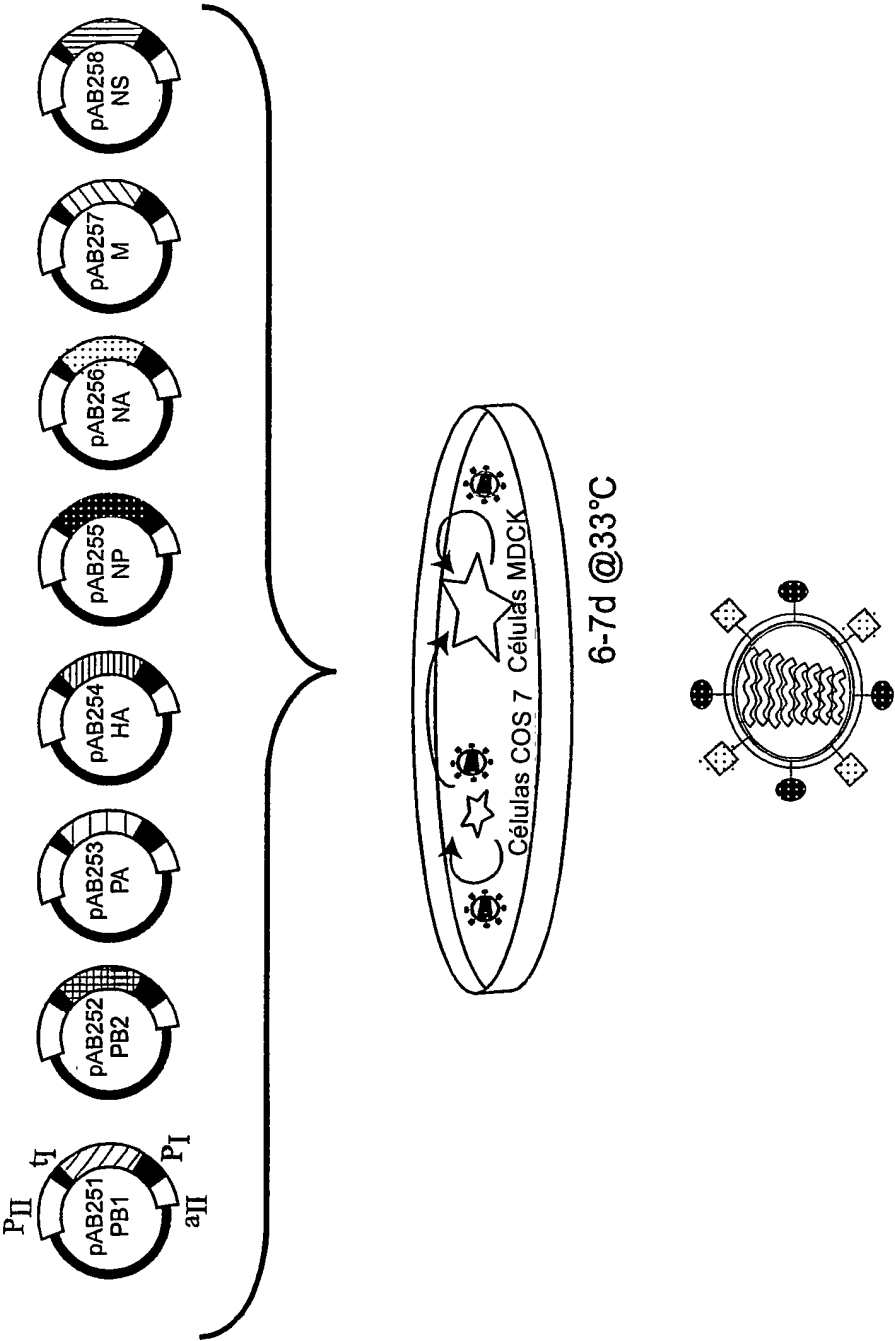


Fig. 4

Fig. 5A

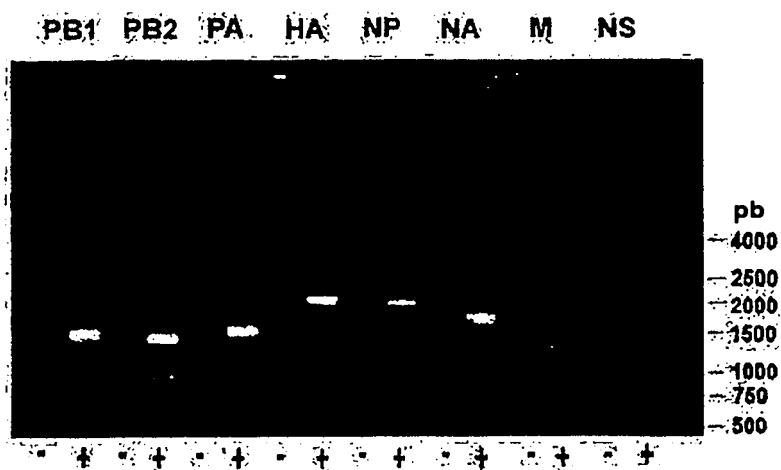
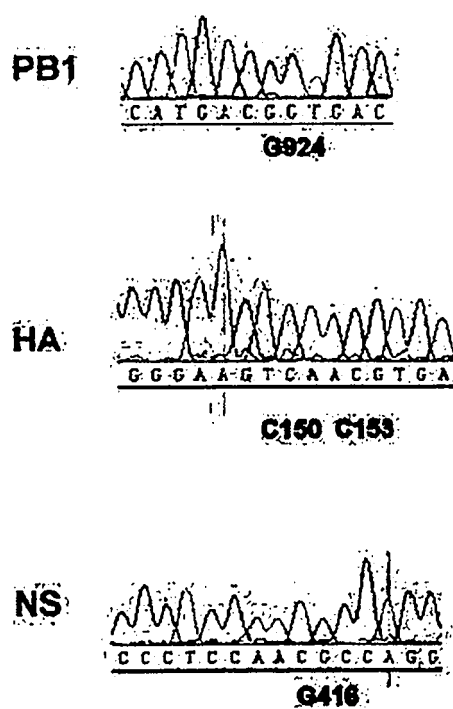
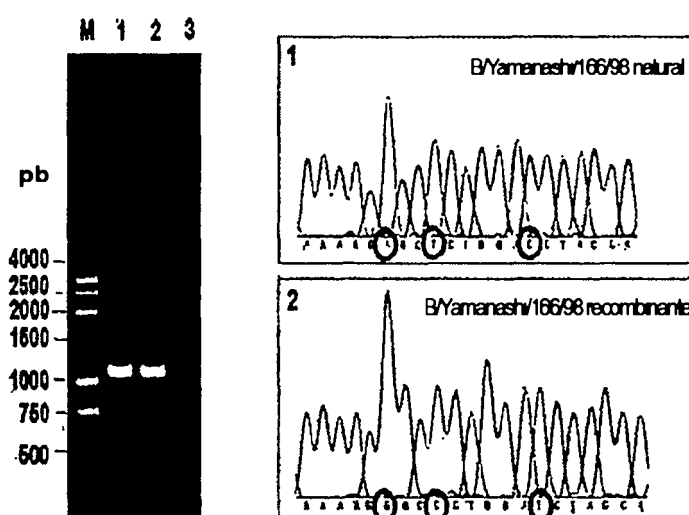


Fig. 5B





2. Secuencia en el formato del Genbank

LOCUS pAD3030 2836 bp DNA circular 14-JAN-2002
 DEFINITION Derivative of pHW2000 with SV40 PolyA Signal replacing 3GH

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

BASE COUNT 717 a 734 c 703 g 682 t

ORIGIN
 1 ctacgaggtta accggaggtac tggctcgacct ccgaaglttg gggggaggag acggtaccgt
 61 ctccaataac ccggcgggccc aaaatgccga ctgggagcga aagatatacc tccccgggg
 121 ccgggagggtc gcgtcaccga ccacgccgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg
 181 tccccaaaaa cgcaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggtaacccc
 241 caggacacac gcgggagcag cgcggggccg gggacgcctt cccggcggtc acctcagaca
 301 tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct
 361 ttattttgtga aattttgtgat gctattgtctt tattttgtaac cattataagc tgcaataaac
 421 aaggatctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggttttgc tattgggccc
 481 tcttcgcgtt cctcgcctac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta
 541 tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag
 601 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
 661 tttttccata ggctcgcgcc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg
 721 tggcgaaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg
 781 cctctcctct ttcgcaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cctctcggga
 841 agcgtggcgc tttctcaatg ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc
 901 tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg accgctgcgc ctatccggt
 961 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaqa cagacttat cgcactggc agcagccact
 1021 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg
 1081 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctcgtct gaagccagtt
 1141 accttcggaa aaagagtttg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg
 1201 gggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
 1261 ttgatctttt ctacgggggtc tgacgctcag tggaaacgaa actcacgtta agggattttg
 1321 gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt

Fig. 6

ES 2 345 492 T3

```

1381 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt
1441 gaggcaccta tctcagcgaat ctgtctatatt cgttcaccca tagttgcctg actcccngtc
1501 gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataccg
1561 cgagaccacac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaagggcc
1621 gagcgagaaa gtgggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgcccgg
1681 gaagctaagag taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttggttg cattgctaca
1741 ggcacgtggg tgtcacgctc gtggtttggt atgggttcat tcagctccgg ttcccaacga
1801 tcaaggcgag ttacatgac ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcgggtcct
1861 ccgacgtgtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggtat ggcagcactg
1921 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgcttt ctgtgactgg tgagtactca
1981 accaagtcac tctgagaata gtgatgctg cyaccyagtt gctcttgccc ggcgtcaata
2041 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaaogttct
2101 tgggggagaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact
2161 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa
2221 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataggggcga cagggaatg ttqaatactc
2281 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga
2341 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga
2401 aaagtgccac ctgacgtcga tatgccaaat acgccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa
2461 tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatgg accttctac ttggcagtac
2521 atctacgtat tagtcacgc tatcccatg gtgatgcgtt tttggcagta catcaatggg
2581 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg
2641 agtttggttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc
2701 ttgacgcaaa tggggcgtag gcgtgtacgg tggcaggtct atataagcag agctctctgg
2761 ctaactagag aacccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctataggqag
2821 acccaagctg ttaacg

```

Fig. 6 Cont.

**ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO DEL MDV-B CON ADNC
EN LOS OCHO PLÁSMIDOS (PAB12[SEGMENTO-N])**

PB1

	*	20	*	40	*	
pAB121-PB1 :	50
MDV-B-PB1 :	50
	AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATGAATATAAAATCCTTATTTCTCTTCAT					
	60	*	80	*	100	
pAB121-PB1 :	100
MDV-B-PB1 :	100
	AGATGTACCCATACAGGCAGCAATTTCAACAACATTCCCATACACCGGTG					
	*	120	*	140	*	
pAB121-PB1 :	150
MDV-B-PB1 :	150
	TTCCCCCTTATTCCCATGGAACGGGAACAGGCTACACAATAGACACCGTG					
	160	*	180	*	200	
pAB121-PB1 :	200
MDV-B-PB1 :	200
	ATTAGAACACATGAGTACTCAAACAAGGGAAAACAATACATTCTGATGT					
	*	220	*	240	*	
pAB121-PB1 :	250
MDV-B-PB1 :	250
	TACAGGATGTGCAATGGTAGATCCAACAAATGGGCCATTACCCGAAGATA					
	260	*	280	*	300	
pAB121-PB1 :	300
MDV-B-PB1 :	300
	ATGAGCCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGCGTTCTGGAGGCTTTGGAT					
	*	320	*	340	*	
pAB121-PB1 :	350
MDV-B-PB1 :	350
	AGAATGGATGAAGAACATCCAGGTCTGTTTCAAGCAGCCTCACAGAATGC					
	360	*	380	*	400	
pAB121-PB1 :	400
MDV-B-PB1 :	400
	CATGGAGGCACTAATGGTCACAACCTGTAGACAAATTAACCCAGGGGAGAC					
	*	420	*	440	*	
pAB121-PB1 :	450
MDV-B-PB1 :	450
	AGACTTTTGATTGGACAGTGTGCAGAAACCAACCTGCTGCAACGGCACTG					
	460	*	480	*	500	
pAB121-PB1 :	500
MDV-B-PB1 :	500
	AACACAACAATAACCTCTTTAGGTTGAATGATTGAATGGAGCCGACAA					

Fig. 7

ES 2 345 492 T3

pAB121-PB1	:*	520	*	540	*	:	550
MDV-B-PB1	:					:	550
		GGGTGGATTAGTACCCTTTTGCCAAGATATCATTGATTCATTGGACAAAC						
pAB121-PB1	:	560	*	580	*	600	:
MDV-B-PB1	:						:
		CTGAAATGACTTTCTTCTCGGTAAAGAATATAAAGAAAAAATGCGCTGCT						
pAB121-PB1	:*	620	*	640	*	:	650
MDV-B-PB1	:					:	650
		AAAAACAGAAAGGGTTTCCTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGA						
pAB121-PB1	:	660	*	680	*	700	:
MDV-B-PB1	:						:
		CAGAATAACCAGAGTGGAATACATCAAAGAGCATTATCATTAAACACAA						
pAB121-PB1	:*	720	*	740	*	:	750
MDV-B-PB1	:					:	750
		TGACAAAAGATGCTGAAAGAGGCCAACTAAAAAGAAGAGCAATTGCCACC						
pAB121-PB1	:	760	*	780	*	800	:
MDV-B-PB1	:						:
		GCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAA						
pAB121-PB1	:*	820	*	840	*	:	850
MDV-B-PB1	:					:	850
		AAATATCTGTGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACG						
pAB121-PB1	:	860	*	880	*	900	:
MDV-B-PB1	:						:
		AGAAGAAGGCCAAACTGTCAAATGCAGTGGCCAAATGCTCAGTAACTGC						
pAB121-PB1	:*	920	*	940	*	:	950
MDV-B-PB1	:G.....					:	950
		CCACCAGGAGGGATCAGCATGACAGTGACAGGAGACAATACTAAATGGAA						
pAB121-PB1	:	960	*	980	*	1000	:
MDV-B-PB1	:						:
		TGAATGCTTAAATCCAAGAATCTTTTGGCTATGACTGAAAGAATAACCA						
pAB121-PB1	:*	1020	*	1040	*	:	1050
MDV-B-PB1	:					:	1050
		GAGACAGCCCAATTTGGTTCCGGGATTTTGTAGTATAGCACCGGTCTTG						
		1060	*	1080	*	1100		

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB121-PB1 : ..... : 1100
MDV-B-PB1 : ..... : 1100
          TTCTCCAATAAAATAGCCAGATTGGGAAAAGGGTCATGATAACAAGCAA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          2160      *      2180      *      2200

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB121-PB1 : ..... : 2200
MDV-B-PB1 : ..... : 2200
          GCACAGCATGCTTGAGGCTATGGCCACAGATTAAGAATGGATGCACGAC

          *      2220      *      2240      *
pAB121-PB1 : ..... : 2250
MDV-B-PB1 : ..... : 2250
          TAGATTATGAATCAGGAAGAATGTCAAAGGATGATTTTGAGAAAGCAATG
          .
          2260      *      2280      *      2300
pAB121-PB1 : ..... : 2300
MDV-B-PB1 : ..... : 2300
          GCTCACCTTGGTGAGATTGGGTACATATAAGCTTCGAAGATCTCTATGGG

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

          2360
pAB121-PB1 : ..... : 2369
MDV-E-PB1 : ..... : 2369
          AAAGGCTCGTGTTCTACT

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

PB2			
	*	20	*
pAB122-PB2	:	: 50
MDV-B-PB2	:	: 50
		AGCAGAAGCGGAGCGTTTTC AAGATGACATTGGCCAAAATTGAATTGTTA	
	60	*	80
pAB122-PB2	:	: 100
MDV-B-PB2	:	: 100
		AAACAAC1G1TAAGGGACAA1GAAGCCAAAACGGTATTGAAACAAACAAC	
	*	120	*
pAB122-PB2	:	: 150
MDV-B-PB2	:	: 150
		GGTAGACCAATATAACATAATAAGAAAATTCAATACATCAAGAATTGAAA	
	160	*	180
pAB122-PB2	:	: 200
MDV-B-PB2	:	: 200
		AGAACCCCTTCATTAAGGATGAAGTGGGCCATGTGTTCTAATTTTCCCTTG	
	*	220	*
pAB122-PB2	:	: 250
MDV-B-PB2	:	: 250
		GCTCTGACCAAGGGTGATATGGCAAATAGAATCCCCTTGGGAATACAAGGG	
	260	*	280
pAB122-PB2	:	: 300
MDV-B-PB2	:	: 300
		AATACAAC1TAAAACAAATGCTGAAGACATAGGAACCAAAGGCCAAATGT	
	*	320	*
pAB122-PB2	:	: 350
MDV-B-PB2	:	: 350
		GCTCAATAGCAGCAGTTACCTGGTGGGAATACATATGGACCAATAGGAGAT	
	360	*	380
pAB122-PB2	:	: 400
MDV-B-PB2	:	: 400
		ACTGAAGGTTTCGAAAAGGTCTACGAAAGCTTTTTTCTCAGAAAGATGAG	
	*	420	*
pAB122-PB2	:	: 450
MDV-B-PB2	:	: 450
		ACTTGACAATGCCACTTGGGGCCGAATAACTTTTGGCCCAGTTGAAAGAG	
	460	*	480
pAB122-PB2	:	: 500
MDV-B-PB2	:	: 500
		TGAGAAAAAGGGTACTGCTAAACCCTCTCACCAAGGAAATGCCTCCAGAT	
	*	520	*
pAB122-PB2	:	: 550
MDV-B-PB2	:	: 550
		GAAGCGAGCAATGTGATAATGGAAATATTGTTCCCTAAAGAAGCAGGAAT	
	560	*	580
		*	600

Fig.7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB122-PB2 : ..... : 600
MDV-B-PB2 : ..... : 600
          ACCAAGAGAATCTACTTGGATACATAGGGAAGTATAAAAGAAAAAGAG

          *          620          *          640          *
pAB122-PB2 : ..... : 650
MDV-B-PB2 : ..... : 650
          AAAAATTGAAAGGAACGATGATAACTCCCATTTGTAAGGCATACATGCTT

          660          *          680          *          700
pAB122-PB2 : ..... : 700
MDV-B-PB2 : ..... : 700
          GAGAGAGAACTGGTTGCCCCGAAGAAGGTTCTGTCAGTGGCAGGAGCAAC

          *          720          *          740          *
pAB122-PB2 : ..... : 750
MDV-B-PB2 : ..... : 750
          ATCAGCCGAGTTCATAGAAATGCTACACTGCTTACAAGGTGAAAATTGGA

          760          *          780          *          800
pAB122-PB2 : ..... : 800
MDV-B-PB2 : ..... : 800
          GACAAATATATCACCCAGGAGGCAATAAACTAACTGAATCTAGGTCTCAA

          *          820          *          840          *
pAB122-PB2 : ..... : 850
MDV-B-PB2 : ..... : 850
          TCAATGATTGTAGCTTGTAGAAAAATAATCAGAAGATCAATAGTCGCATC

          860          *          880          *          900
pAB122-PB2 : ..... : 900
MDV-B-PB2 : ..... : 900
          AAACCCACTAGAGCTAGCTGTAGAAATTGCAAACAAGACTGTGATAGATA

          *          920          *          940          *
pAB122-PB2 : ..... : 950
MDV-B-PB2 : ..... : 950
          CTGAACCTTTAAATCATGTCTGGCAGCCATAGACGGAGGTGATGTAGCC

          960          *          980          *          1000
pAB122-PB2 : ..... : 1000
MDV-B-PB2 : ..... : 1000
          TGTGACATAATAAGAGCTGCATTAGGACTAAAGATCAGACAAAGACAAAG

          *          1020          *          1040          *
pAB122-PB2 : ..... : 1050
MDV-B-PB2 : ..... : 1050
          ATTTGGACGGCTTGAAGTAAAGAGAAATATCAGGAAGAGGATTCAAAAATG

          1060          *          1080          *          1100
pAB122-PB2 : ..... : 1100
MDV-B-PB2 : ..... : 1100
          ATGAAGAAATATTAATCGGGAACGGAACAATACAGAAAATTGGAATATGG

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1660          *      1680          *      1700

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB122-PB2 : ..... : 1700
MDV-B-PB2 : ..... : 1700
          CCAAAGAACTGGTGCAAAACACCTACCAATGGGTGCTAAAAAATTGGTA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

                2360      *      2380      *
pA3122-PB2 : ..... : 2396
MDV-B-PB2  : ..... : 2396
            TTAATTCAATAGACACAATTGAGTGAAAAATGCTCGTGTTCCTACT

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

PA			
	*	20	*
pAB123-PA :		50
MDV-B-PA :		50
	AGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTGCCATAATGGATACTTTTATTACAAGA		
	60	*	80
pAB123-PA :		100
MDV-B-PA :		100
	AACITCCAGACTACAATAATACAAAAGGCCAAAAACACAATGGCAGAATT		
	*	120	*
pAB123-PA :		150
MDV-B-PA :		150
	TAGTGAAGATCCTGAATTACAACCAGCAATGCTATTCAACATCTGCGTCC		
	160	*	180
pAB123-PA :		200
MDV-B-PA :		200
	ATCTGGAGGTCTGCTATGTAATAAGTGATATGAATTTCTTGATGAAGAA		
	*	220	*
pAB123-PA :		250
MDV-B-PA :		250
	GGAAAAACATATACAGCATTAGAAGGACAAGGAAAAGAACAAAACCTTGAG		
	260	*	280
pAB123-PA :		300
MDV-B-PA :		300
	ACCACAATATGAAGTGATTGAGGGAATGCCAAGAAACATAGCATGGAATGG		
	*	320	*
pAB123-PA :		350
MDV-B-PA :		350
	TTCAAAGATCCTTAGCCCAAGAGCATGGAATAGAGACTCCAAGGTATCTG		
	360	*	380
pAB123-PA :		400
MDV-B-PA :		400
	GCTGATTTGTTCGATTATAAAACCAAGAGGTTTATAGAAGTTGGAATAAC		
	*	420	*
pAB123-PA :		450
MDV-B-PA :		450
	AAAGGGATTGGCTGACGATTACTTTTGGAAAAAGAAAGAAAAGCTGGGGA		
	460	*	480
pAB123-PA :		500
MDV-B-PA :		500
	ATAGCATGGAAGTATGATATTCAGCTACAATCAAGACTATTCGTTAAGT		
	*	520	*
pAB123-PA :		550
MDV-B-PA :		550
	AATGAATCCTCATTGGATGAGGAAGGAAAAGGGAGAGTGCTAAGCAGACT		
	560	*	580
pAB123-PA :		600

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1660      *      1680      *      1700

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB123-PA : ..... : 1700
MDV-B-PA : ..... : 1700
          TTGGCTCCTTATTTGTGAGTGGAAGGGAAAAATCTGTGTACCTATATTGC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

HA					
		*	20	*	40
MDV-B-HA	:			50
pAB124-HA	:			50
		AGCAGAAGCAGAGCATTTCCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGT			
		60	*	80	*
MDV-B-HA	:			100
pAB124-HA	:			100
		ACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAA			
		*	120	*	140
MDV-B-HA	:			150
pAB124-HA	:			150
		CATCGTCAAACCTCACCCCATGTGGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAAGTC			
		160	*	180	*
MDV-B-HA	:	..t.....			200
pAB124-HA	:			200
		AACGTGACTGGTGTGATACCACTGACAACAACACCTACCAAATCTCATTT			
		*	220	*	240
MDV-B-HA	:			250
pAB124-HA	:			250
		TGCAAATCTCAAAGGAACACAGACCAGAGGGAACTATGCCCAAACCTGTC			
		260	*	280	*
MDV-B-HA	:			300
pAB124-HA	:			300
		TCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAGTGTATGGGG			
		*	320	*	340
MDV-B-HA	:			350
pAB124-HA	:			350
		ACCATACCTTCGGCAAAAGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTAC			
		360	*	380	*
MDV-B-HA	:			400
pAB124-HA	:			400
		ATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAATCAGACAGCTAC			
		*	420	*	440
MDV-B-HA	:			450
pAB124-HA	:			450
		CCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAGCCCGTAACGTT			
		460	*	480	*
MDV-B-HA	:			500
pAB124-HA	:			500
		ATCAACGCAGAAACGGCACCAGGAGGACCCTACATAGTTGGAACCTCAGG			
		*	520	*	540
MDV-B-HA	:			550
pAB124-HA	:			550
		ATCTTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAAGGATTCTTCGCAACAATGGCTT			
		560	*	580	*
MDV-B-HA	:			600

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB124-HA : ..... : 600
          GGGCTGTCCCAAAAAACAACAAAACCAAAACAGCAACGAACCCATTAACA

          *          620          *          640          *
MDV-B-HA : ..... : 650
pAB124-HA : ..... : 650
          GTAGAAGTACCATACATTTGTACAAAAGGAGAAGACCAAATTACTGTTTG

          660          *          680          *          700
MDV-B-HA : ..... : 700
pAB124-HA : ..... : 700
          GGGGTTCCAITCTGATGACGAAACCCAAATGGTAACACTCTATGGAGACT

          *          720          *          740          *
MDV-B-HA : ..... : 750
pAB124-HA : ..... : 750
          CGAAGCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTAACCACACATTAT

          760          *          780          *          800
MDV-B-HA : ..... : 800
pAB124-HA : ..... : 800
          GTTCTCAGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAAGACGAAGGGCTACC

          *          820          *          840          *
MDV-B-HA : ..... : 850
pAB124-HA : ..... : 850
          ACAAGCGGCAGAAATGTTGTTGATTACATGCTCAAAAACCTGGAAAAA

          860          *          880          *          900
MDV-B-HA : ..... : 900
pAB124-HA : ..... : 900
          CAGGAACAATGTCTTAACAAAGAGGTGTTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGG

          *          920          *          940          *
MDV-B-HA : ..... : 950
pAB124-HA : ..... : 950
          TGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGGGCCTTGCTTTAATTGG

          960          *          980          *          1000
MDV-B-HA : ..... : 1000
pAB124-HA : ..... : 1000
          TGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGC

          *          1020          *          1040          *
MDV-B-HA : ..... : 1050
pAB124-HA : ..... : 1050
          CTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGG

          1060          *          1080          *          1100
MDV-B-HA : ..... : 1100
pAB124-HA : ..... : 1100
          GTGAAAACACCCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGC

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

		*	1120	*	1140	*	
MDV-B-HA	:			: 1150
pAB124-HA	:			: 1150
		AAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTGG					
			1160	*	1180	*	1200
MDV-B-HA	:			: 1200
pAB124-HA	:			: 1200
		AAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCAT					
		*	1220	*	1240	*	
MDV-B-HA	:			: 1250
pAB124-HA	:			: 1250
		GGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCAGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGC					
			1260	*	1280	*	1300
MDV-B-HA	:			: 1300
pAB124-HA	:			: 1300
		TATAAACAAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTAAGTGAGCTAGAAGTAA					
		*	1320	*	1340	*	
MDV-B-HA	:			: 1350
pAB124-HA	:			: 1350
		AGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCAATGGATGAACTCCACAACGAAATA					
			1360	*	1380	*	1400
MDV-B-HA	:			: 1400
pAB124-HA	:			: 1400
		CTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTC					
		*	1420	*	1440	*	
MDV-B-HA	:			: 1450
pAB124-HA	:			: 1450
		GCAAAATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTG					
			1460	*	1480	*	1500
MDV-B-HA	:			: 1500
pAB124-HA	:			: 1500
		AAGATGAGCATCTCTTGGCACTTGAAAGAAAAGTGAAGAAAATGCTGGGC					
		*	1520	*	1540	*	
MDV-B-HA	:			: 1550
pAB124-HA	:			: 1550
		CCCTCTGCTGTAGACATAGGGAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAATG					
			1560	*	1580	*	1600
MDV-B-HA	:			: 1600
pAB124-HA	:			: 1600
		CAACCAGACTTGCCTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAG					
		*	1620	*	1640	*	
MDV-B-HA	:			: 1650
pAB124-HA	:			: 1650
		AATTTCTCTTCCCACTTTTGATTCATAAATATTACTGCTGCATCTTTA					
			1660	*	1680	*	1700

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

MDV-B-HA : ..... : 1700
pAB124-HA : ..... : 1700
          AATGATGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTCTACTACTCAACTGC

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

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

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

MDV-B-NP : ..... : 600
          TACTTCAGCCCTATAAGAATTACCTTTTAAAAGAAAGAGGTGAAAACAAT

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

          660      670      680      690      700
pAB125-NP : ..... : 700
MDV-B-NP : ..... : 700
          T'GATTGGGCATT'CACAGATGAACGATG'CTGTTTCCAAAGATCAAAGGCA

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig 7. Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

      1660      1670      1680      1690      1700
pAB125-NP : ..... : 1700

```

Fig 7. Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

      1660      1670      1680      1690      1700
pAB125-NP : ..... : 1700

```

Fig 7. Cont.

ES 2 345 492 T3

```

MDV-B-NP : ..... : 1700
          (AATCCCATGAGATTCCAA1TAAGCAGACCATCCCCAATTTCTTCTTTG

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

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

          1810      1820      1830      1840      1850
pAB125-NP : ..... : 1842
MDV-B-NP : ..... : 1842
          ACTTTTATTGAAATAAATGTAAAAAA1GCTGTGTGTTTCTACT

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

NA

```

                *      20      *      40      *
pAB126-NA : ..... : 50
MDV-B-NA : ..... : 50
            AGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCAAAACTGAAGCAAATAGGCCAAAAATGA

                60      *      80      *      100
pAB126-NA : ..... : 100
MDV-B-NA : ..... : 100
            ACAATGCTACCTTCAACTATACAAACGTTAACCTATTCTCACATCAGG

                *      120      *      140      *
pAB126-NA : ..... : 150
MDV-B-NA : ..... : 150
            GGGAGTGTTATTATCACTATATGTGTCAGCTTCACTGTCATACTTATTGT

                160      *      180      *      200
pAB126-NA : ..... : 200
MDV-B-NA : ..... : 200
            ATTTCGGATATATTGCTAAAATTTTCACCAACAAAAATAACTGCACCAACA

                *      220      *      240      *
pAB126-NA : ..... : 250
MDV-B-NA : ..... : 250
            ATGTCATTGGATTGCGCAACGTATCAAATGTTTCAGGCTGTGAACCGTTC

                260      *      280      *      300
pAB126-NA : ..... : 300
MDV-B-NA : ..... : 300
            TGCAACAAAAGAGATGACATTTCTTCTCCCAGAGCCGGAGTGGACATACC

                *      320      *      340      *
pAB126-NA : ..... : 350
MDV-B-NA : ..... : 350
            CTCGTTTATCTTGCCAGGGCTCAACCTTTCAGAAAGCACTCCTAATTAGC

                360      *      380      *      400
pAB126-NA : ..... : 400
MDV-B-NA : ..... : 400
            CCTCATAGGTTTCGGAGAAACCAGAGAAACTCAGCTCCCTTGATAATAAG

                *      420      *      440      *
pAB126-NA : ..... : 450
MDV-B-NA : ..... : 450
            GGAACCCTTTGTTGCTTGTGGACCAAAGGAATGCAGACACTTTGCTCTAA

                460      *      480      *      500
pAB126-NA : ..... : 500
MDV-B-NA : ..... : 500
            CCCATTATGCAGCTCAACCAGGGGATACTACAATGGAACAAGAAAGGAC

                *      520      *      540      *
pAB126-NA : ..... : 550
MDV-B-NA : ..... : 550
            AGAAACAAGCTGAGGCATCTGATTTTCAGTCAAATTAGGCAAAATCCCAAC

                560      *      580      *      600

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

pAB126-NA : ..... : 600
MDV-B-NA : ..... : 600
          TGTAGAAAACCTCCATTTTCCACATGGCAGCTTGGAGTGGGTCCGCATGCC

          *          620          *          640          *
pAB126-NA : ..... : 650
MDV-B-NA : ..... : 650
          ATGATGGTAGAGAATGGACATATATCGGAGTTGATGGCCCTGACAGTAAT

          660          *          680          *          700
pAB126-NA : ..... : 700
MDV-B-NA : ..... : 700
          GCACTGATCAAAAATAAAATATGAGCAAGCATATACTGACACATACCATTC

          *          720          *          740          *
pAB126-NA : ..... : 750
MDV-B-NA : ..... : 750
          CTATGCAAAACAACATCCTAAGAACACAAGAAAGTGCCTGCAATTGCATCG

          760          *          780          *          800
pAB126-NA : ..... : 800
MDV-B-NA : ..... : 800
          GGGGAGATTGTTATCTTATGATAACTGATGGCTCAGCTTCAGGAATTAGT

          *          820          *          840          *
pAB126-NA : ..... : 850
MDV-B-NA : ..... : 850
          AAATGCAGATTTCTTAAATTCGAGAGGGTCGAATAATAAAAGAAATATT

          860          *          880          *          900
pAB126-NA : ..... : 900
MDV-B-NA : ..... : 900
          TCCAACAGGAAGAGTAGAGCATACTGAACAATGCACATGCCGGTTCGCCA

          *          920          *          940          *
pAB126-NA : ..... : 950
MDV-B-NA : ..... : 950
          GCAATAAAACCATAGAAATGTGCCTGTAGAGATAACAGTTACACAGCAAAA

          960          *          980          *          1000
pAB126-NA : ..... : 1000
MDV-B-NA : ..... : 1000
          AGACCCCTTGTCAAATTAAATGTGGAGACTGATACAGCTGAAATAAGATT

          *          1020          *          1040          *
pAB126-NA : ..... : 1050
MDV-B-NA : ..... : 1050
          GATGTGCACAGAGACTTATTTGGACACCCCCAGACCAGATGATGGAAGCA

          1060          *          1080          *          1100
pAB126-NA : ..... : 1100
MDV-B-NA : ..... : 1100
          TAACAGGGCCTTCCGAATCTAATCGGGACAAAGGGCTTCAGGCATCAAA

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig 7. Cont.

ES 2 345 492 T3

M					
		*	20	*	40
pAB127-M	:			50
MDV-B-M	:			50
		AGCAGAAGCACGCACCTTTCTTAAATGTCGCTGTTGGAGACACAATTGC			
		60	*	80	*
pAB127-M	:			100
MDV-B-M	:			100
		CTACCTGCTTTCACCTAACAGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAG			
		*	120	*	140
pAB127-M	:			150
MDV-B-M	:			150
		AAAAATTACACTGTTGGTTCGGTGGGAAAGAATTTGACCTAGACTCTGCT			
		160	*	180	*
pAB127-M	:			200
MDV-B-M	:			200
		TTGGAATGGATAAAAAACAAAAGATGCCTAACTGATATACAAAAAGCACT			
		*	220	*	240
pAB127-M	:			250
MDV-B-M	:			250
		AATTGGTGCCTCTATCTGCTTTTTAAACCCAAAGACCAAGAAAGAAAAA			
		260	*	280	*
pAB127-M	:			300
MDV-B-M	:			300
		GAAGATTCATCACAGAGCCCCTGTCAGGAATGGGAACAACAGCAACAAAA			
		*	320	*	340
pAB127-M	:			350
MDV-B-M	:			350
		AAGAAAGGCCTGATTCTAGCTGAGAGAAAAATGAGAAGATGTGTGAGTTT			
		360	*	380	*
pAB127-M	:			400
MDV-B-M	:			400
		TCATGAAGCATTTGAAATAGCAGAAGGCCATGAAAGCTCAGCACTACTAT			
		*	420	*	440
pAB127-M	:			450
MDV-B-M	:			450
		ATTGTCTCATGGTCATGTACCTGAACCCTGGAAATTATCAATGCAAGTA			
		460	*	480	*
pAB127-M	:			500
MDV-B-M	:			500
		AAACTAGGAACGCTCTGTGCTTTATGCGAGAAACAAGCATCACATTCACA			
		*	520	*	540
pAB127-M	:			550
MDV-B-M	:			550
		AAGAGCTCATAGCAGAGCAGCAAGATCTTCAGTGCCTGGAGTGAGGCGAG			
		560	*	580	*
pAB127-M	:			600

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1060          *          1080          *          1100
pAB127-M : ..... : 1100
MDV-B-M : ..... : 1100
          AGATAATAAAAATGGGTGAAACAGTTTGGAGGTAGAAGAATTGCAGTAA

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

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

          1160      *      1180      *
pAB127-M : ..... : 1190
MDV-B-M  : ..... : 1190
          ATGTCAGCAAATAAACTGGAAAAAGTGC GTTGT TTTCTACT

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

NS					
	10	20	30	40	50
pAB128-NS	:	:		50
MDV-B-NS	:	:		50
		AGCAGAAGCAGAGGATTTGTTTAGTCACTGGCAAACGGAAAAAATGGCG			
	60	70	80	90	100
pAB128-NS	:	:		100
MDV-B-NS	:	:		100
		GACAACATGACCACAACACAAATTGAGGTAGGTCCGGGAGCAACCAATGC			
	110	120	130	140	150
pAB128-NS	:	:		150
MDV-B-NS	:	:		150
		CACCATAAACTTTGAAGCAGGAATTCTGGAGTGCTATGAAAGGCTTTCAT			
	160	170	180	190	200
pAB128-NS	:	:		200
MDV-B-NS	:	:		200
		GGCAAAGAGCCCTTGACTACCCTGGTCAAGACCGCTAAACAGACTAAAG			
	210	220	230	240	250
pAB128-NS	:	:		250
MDV-B-NS	:	:		250
		AGAAAATTAGAATCAAGAATAAAGACTCACAACAAAAGTGAGCCTGAAAG			
	260	270	280	290	300
pAB128-NS	:	:		300
MDV-B-NS	:	:		300
		TAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAGCAATTGGGGTAAAAATGATGA			
	310	320	330	340	350
pAB128-NS	:	:		350
MDV-B-NS	:	:		350
		AAGTGCTCCTATTTATGAATCCATCTGCTGGAATTGAAGGGTTTGAGCCA			
	360	370	380	390	400
pAB128-NS	:	:		400
MDV-B-NS	:	:		400
		TACTGTATGAAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAACTGCAATTGGAC			
	410	420	430	440	450
pAB128-NS	:G.....	:		450
MDV-B-NS	:	:		450
		CGATTACCCTCCAACACCAGGAAAGTGCCTTGATGACATAGAAGAAGAAC			
	460	470	480	490	500
pAB128-NS	:	:		500
MDV-B-NS	:	:		500
		CGGAGAATGTTGATGACCCAAGTAAATAGTATTGAGGGACATGAACAAC			
	510	520	530	540	550
pAB128-NS	:	:		550
MDV-B-NS	:	:		550
		AAAGATGCAAGGCAAAAGATAAAGGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGG			
	560	570	580	590	600
pAB128-NS	:	:		600

Fig. 7 Cont.

ES 2 345 492 T3

```

MDV-B-NS : ..... : 600
           GAAGTTCCGTTTGACAATAAAAAGGGATATACGTAATGTGTTGTCCTTGA

           610      620      630      640      650
pAB128-NS : ..... : 650
MDV-B-NS : ..... : 650
           GAGTGTTGGTAAACGGAACATTCTCAAGCACCCCTAATGGATACAAGTCC

           660      670      680      690      700
pAB128-NS : ..... : 700
MDV-B-NS : ..... : 700
           TTATCAACTCTGCATAGATTGAATGCATATGACCAGAGTGGGAGGCTTGT

           710      720      730      740      750
pAB128-NS : ..... : 750
MDV-B-NS : ..... : 750
           TGCTAAACTTGTGCTACTGATGATCTTACAGTGGAGGATGAAGAAGATG

           760      770      780      790      800
pAB128-NS : ..... : 800
MDV-B-NS : ..... : 800
           GCCATCGGATCCTCAACTCACTCTTCGAGCGTTTTAATGAAGGACATTCA

           810      820      830      840      850
pAB128-NS : ..... : 850
MDV-B-NS : ..... : 850
           AAGCCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTGGGAGTCTTATCCCAATTGG

           860      870      880      890      900
pAB128-NS : ..... : 900
MDV-B-NS : ..... : 900
           TCAAGAGCACCGATTATCACCAGAGGAGGGAGACAATTAGACTGTTACG

           910      920      930      940      950
pAB128-NS : ..... : 950
MDV-B-NS : ..... : 950
           GAAGAACTTTATCTTTTAAGTAAAAGAATTGATGATAACATATTGTTCCA

           960      970      980      990      1000
pAB128-NS : ..... : 1000
MDV-B-NS : ..... : 1000
           CAAAACAGTAATAGCTAACAGCTCCATAATAGCTGACATGATTGTATCAT

           1010     1020     1030     1040     1050
pAB128-NS : ..... : 1050
MDV-B-NS : ..... : 1050
           TATCATTATTGGAAACATTGTATGAAATGAAGSATGTGGTTGAAGTGTAC

           1060     1070     1080     1090
pAB128-NS : ..... : 1098
MDV-B-NS : ..... : 1098
           AGCAGGCAGTGCTTGTGAATTTAAATAAAAATCCTCTTGTTACTACT

```

Fig. 7 Cont.

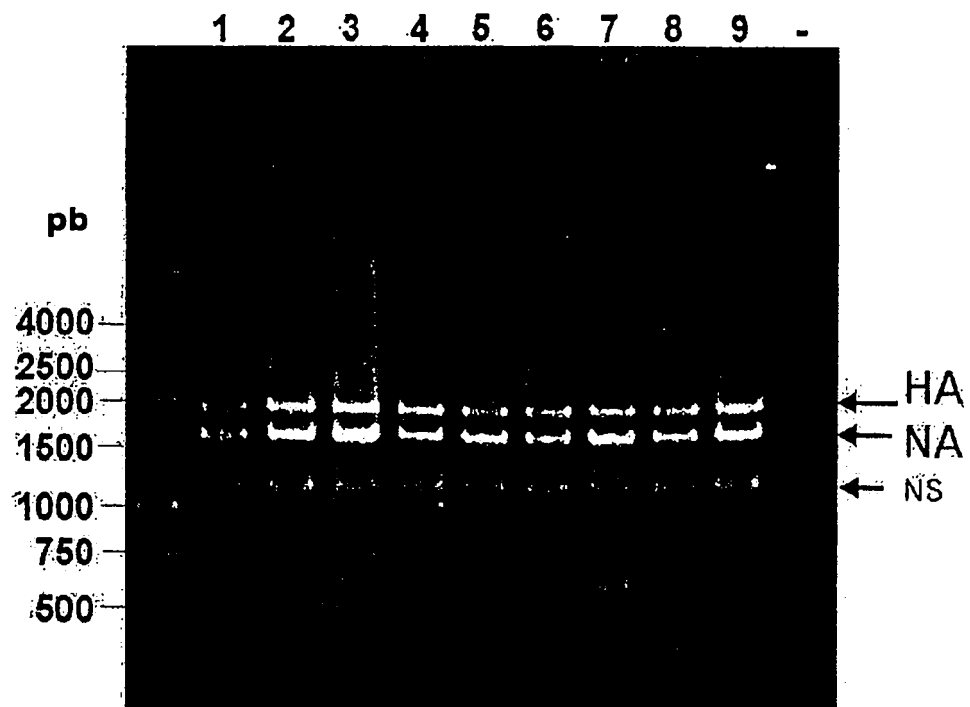


Fig. 8

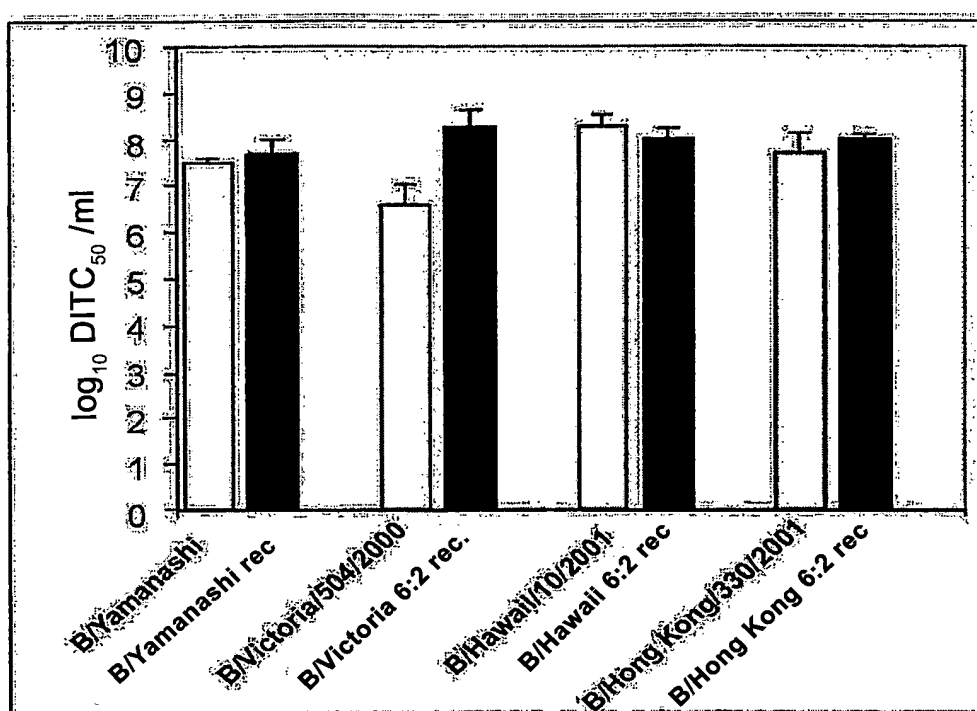


Fig. 9

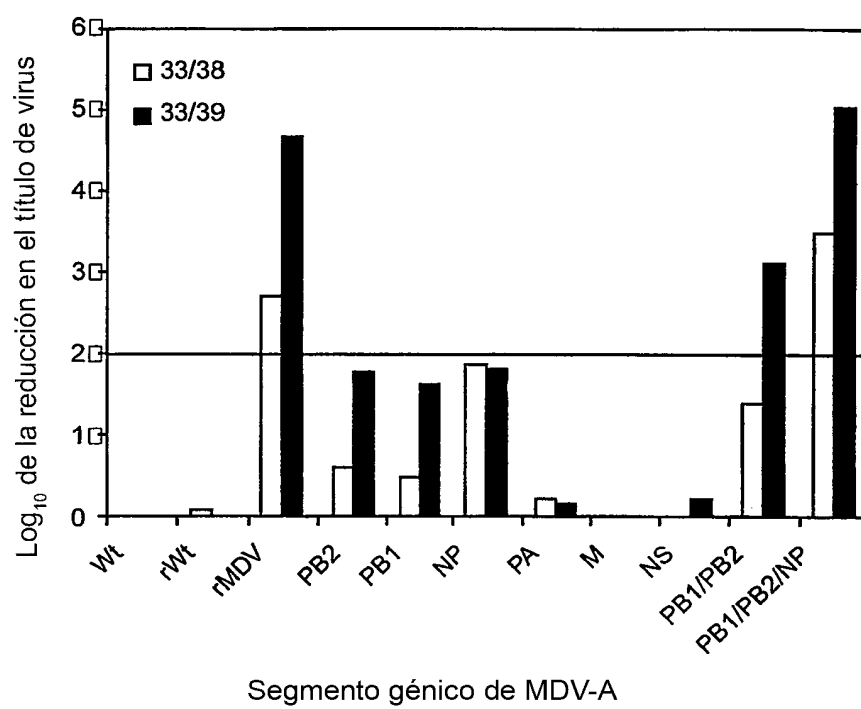


Fig. 10

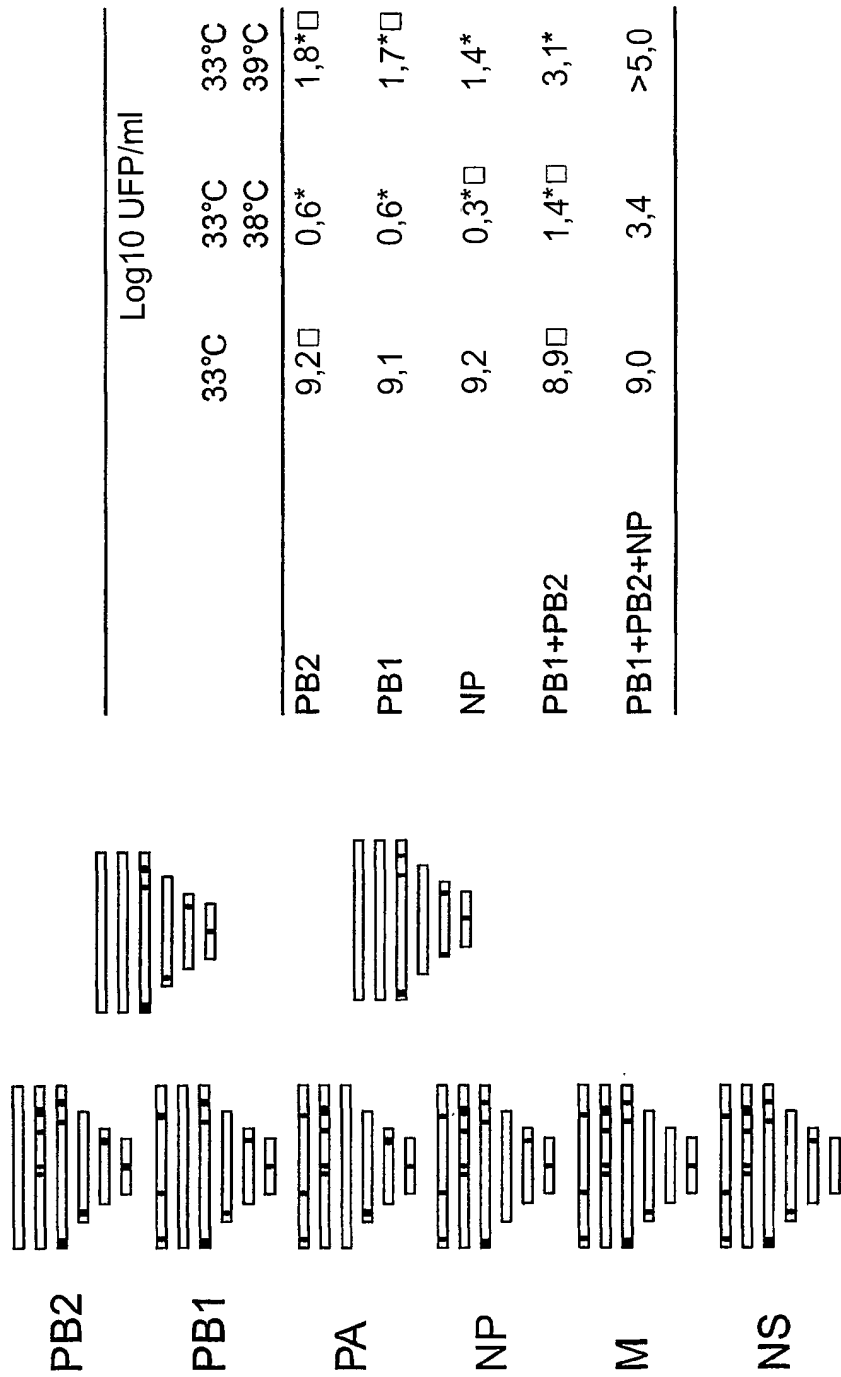


Fig. 11

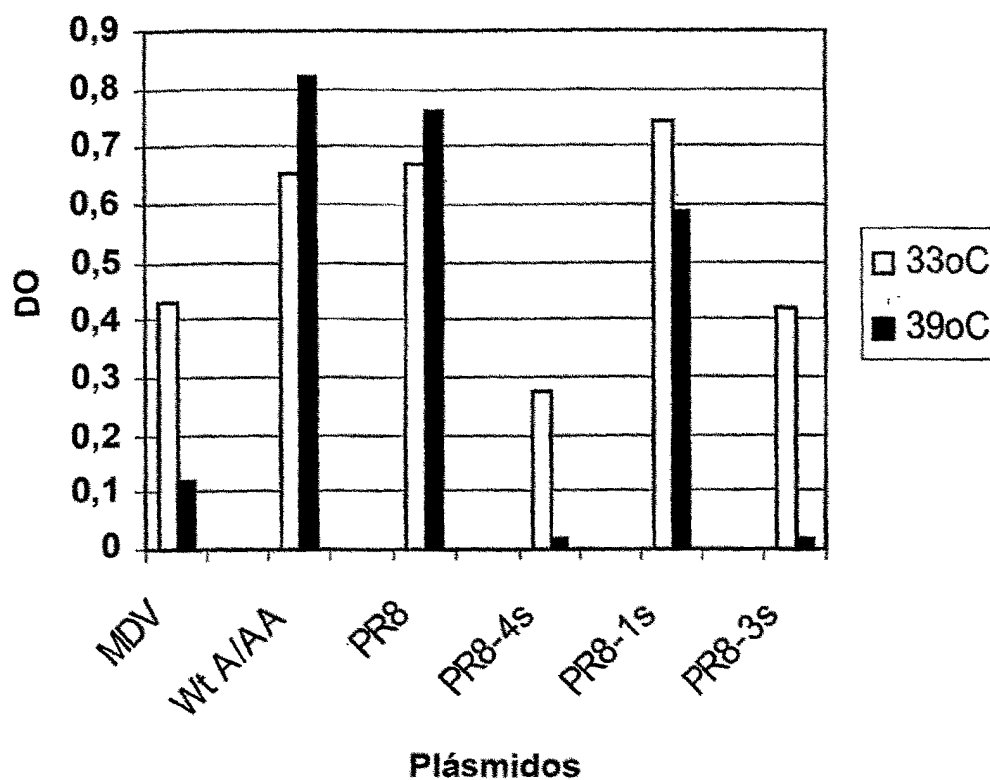


Fig. 12A

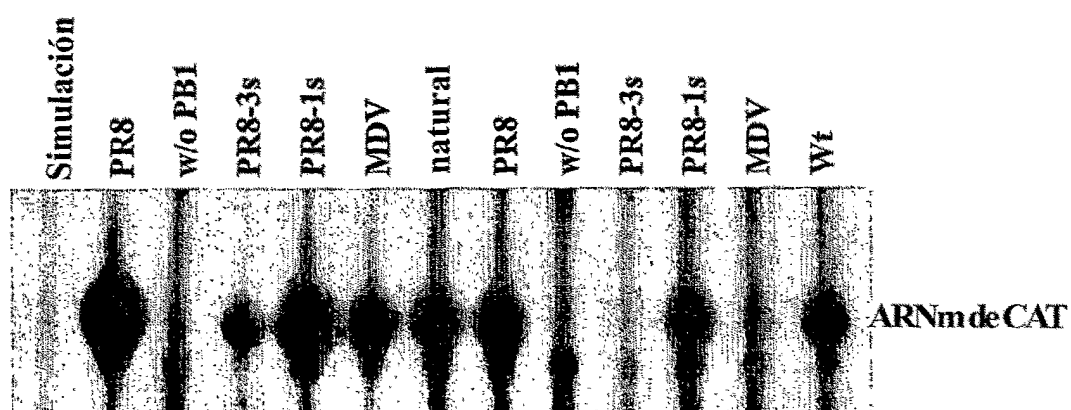


Fig. 12B

PA			NP			M1			MDCK log ufp/ml	PCK log DITC50 /ml	
431	497	55	114	410	509	159	183	33°C 37°C Δlog		33°C 37°C Δlog	
M H	A A	H T	Q V	ts	6,6	<2	>3	5,6	3,0	2,6	
V Y	T V	P A	H M	sin ts	7,6	6,6	1,0	8,1	7,4	0,7	
V Y	A V	P A	H M	sin ts	7,6	7,1	0,5	7,4	6,5	0,95	
V Y	A V	P A	H M	sin ts	8,1	7,1	1,0	7,7	6,5	1,20	
M H	A A	H T	Q V	ts	7,1	3,1	4,0	7,1	3,5	3,6	
V Y	T V	P A	H M	sin ts	8,1	7,1	1,0	8,7	7,8	0,9	
V Y	A V	P A	H M	sin ts	8,1	7,2	0,9	8,5	7,8	0,7	

Fig. 13

PA			NP			M1			MDCK log ufp/ml	PCK log DITC50 /ml				
431	497	55	114	410	509	159	183	33°C		37°C	Δlog			
M	H	A	A	H	T	H	M	ts	7,1	3,2	3,9	6,2	3,3	2,9
M	H	A	V	P	A	Q	V	ts	n.d.			5,8	2,9	2,9
V	Y	A	A	H	T	Q	V	ts	6,2	3,2	3,0	6,1	2,7	3,4
V	Y	A	A	H	T	H	M	ts	7,4	4,4	3,0	7,5	3,4	4,1
V	Y	A	A	H	T	H	M	ts	7,6	4,2	3,4	8,3	4,3	4,0
M	H	A	V	P	A	H	M	ts	7,4	4,4	3,0	8,1	4,3	3,8
M	H	T	V	P	A	H	M	ts	8,0	6,0	2,0	8,4	4,3	4,1
V	Y	T	V	P	A	Q	V	sin ts	5,6	6,0	-0,4	6,4	4,5	1,9
V	Y	T	V	P	A	Q	V	sin ts	6,6	5,8	0,8	6,8	4,8	2,0

Fig. 14

PA		NP				M1	
431	497	55	114	410	509	159	183
V Y		A V	P T			Q V	
				sin ts			
V Y		A A	P T			Q V	
				sin ts			
V Y		A A	P T			Q V	
				sin ts			
V Y		T A	H T			Q V	
				ts			
V Y		A A	P T			H M	
				sin ts			
V Y		T A	P T			H M	
				sin ts			
				n.d.			
		MDCK log ufp/ml		PCK log DITC50 /ml			
		33°C 37°C Δlog		33°C 37°C Δlog			
		6,2	5,2	1,0	6,8	5,5	1,4
		6,8	6,4	0,4	7,2	6,1	1,1
		6,4	6,2	0,2	7,1	5,7	1,4
		6,6	4,4	2,2	6,6	3,4	3,2
		7,4	6,8	0,6	8,3	7,0	1,3
		n.d.			8,0	7,2	0,8

Fig. 15

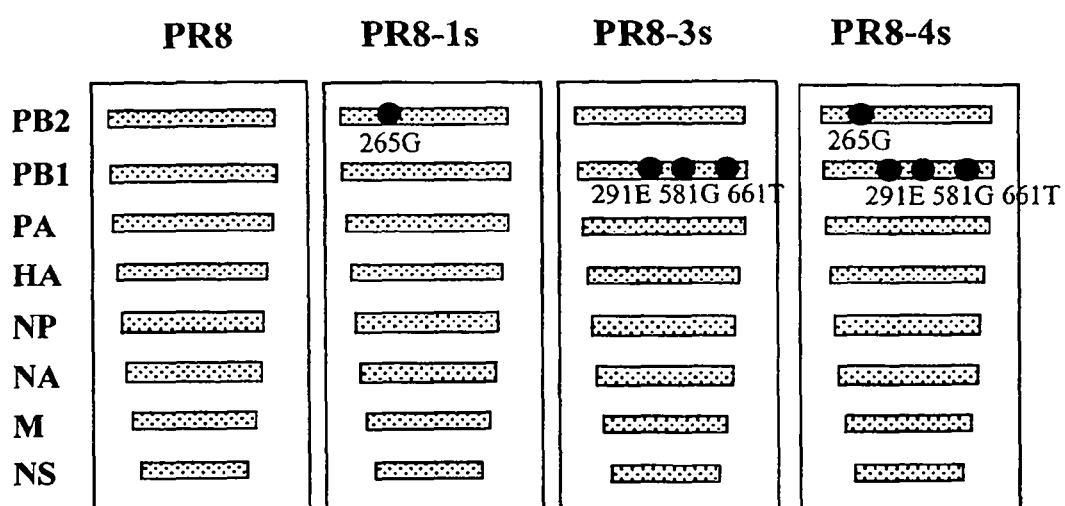


Fig. 16

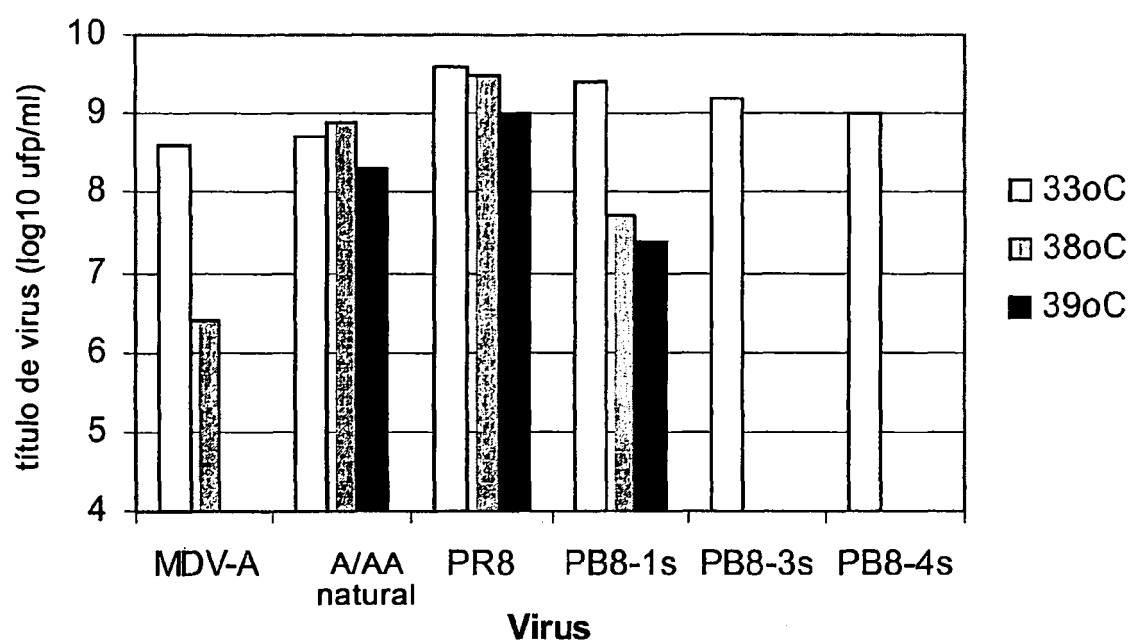


Fig. 17

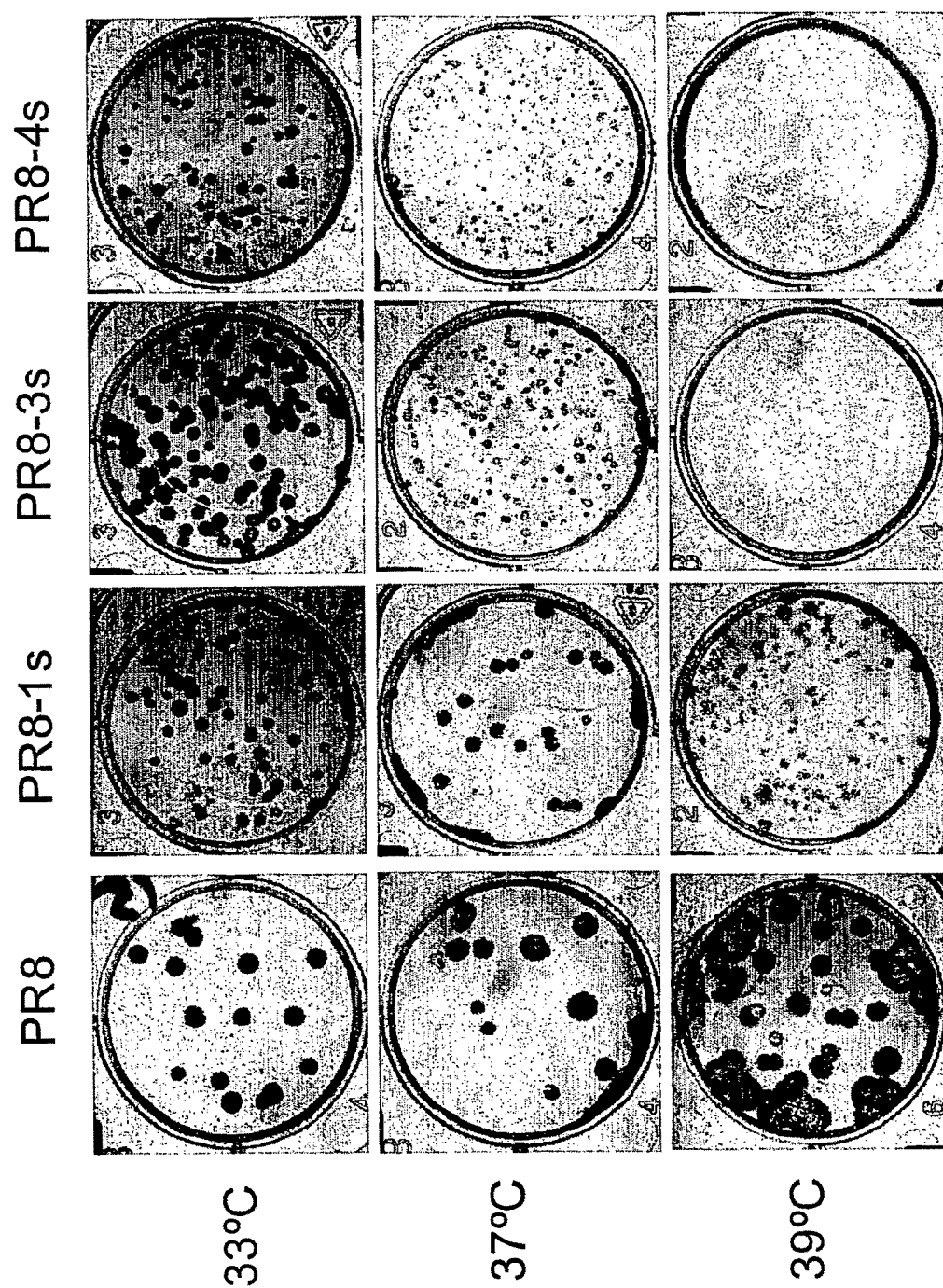


Fig. 18

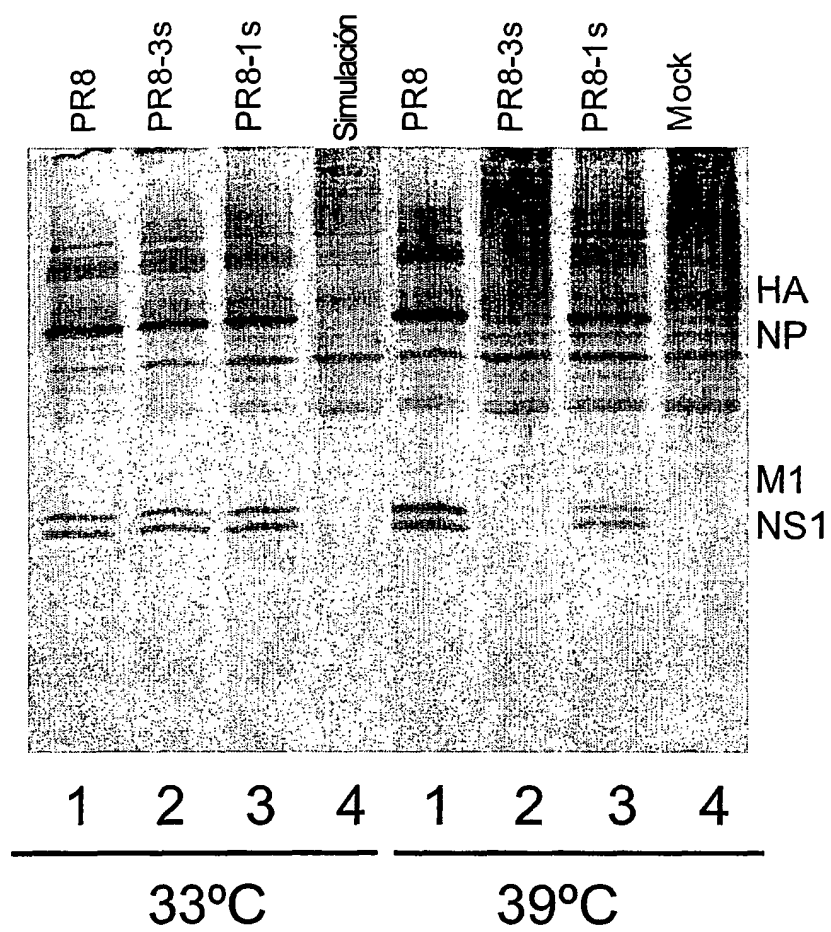


Fig. 19

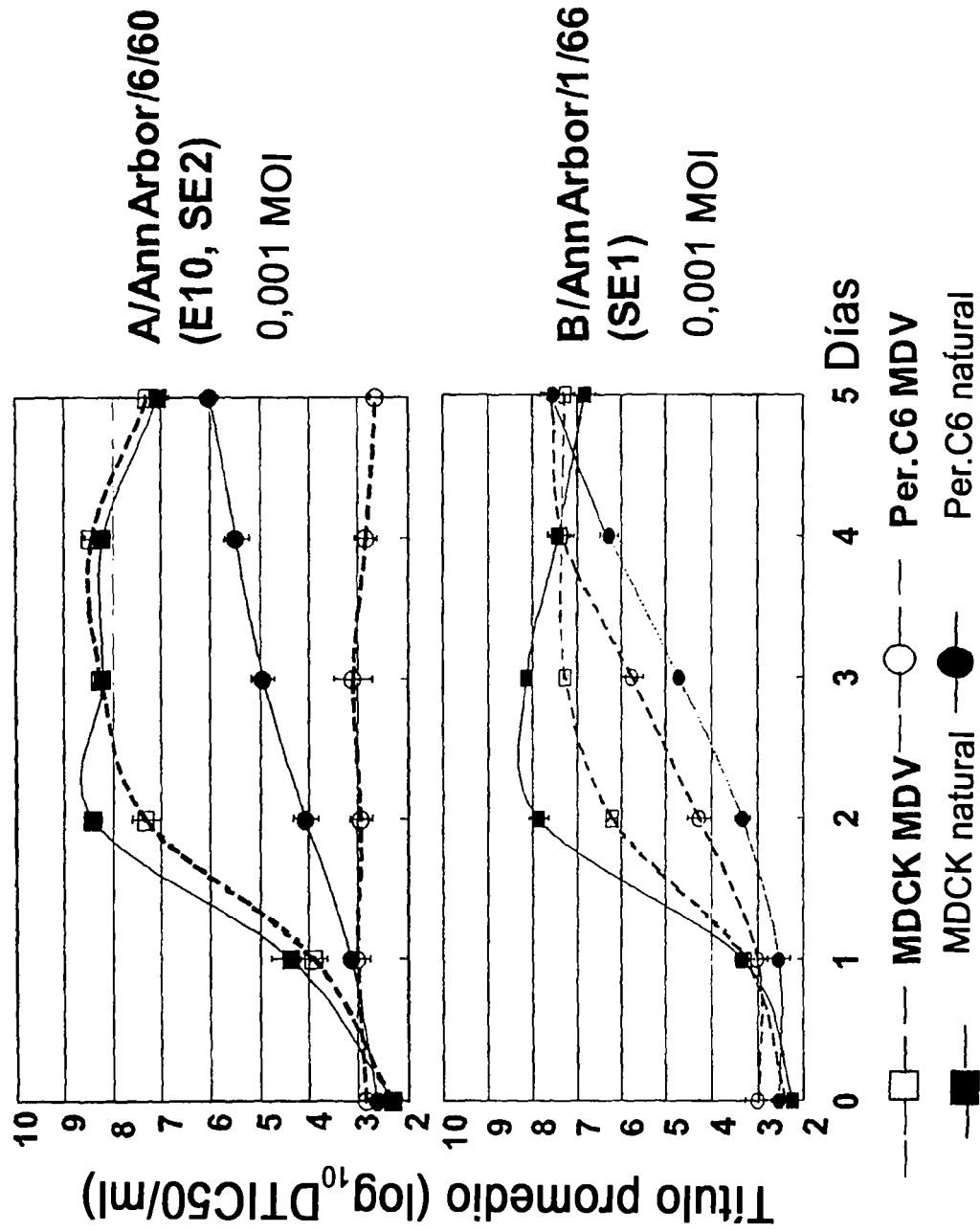


Fig. 20A

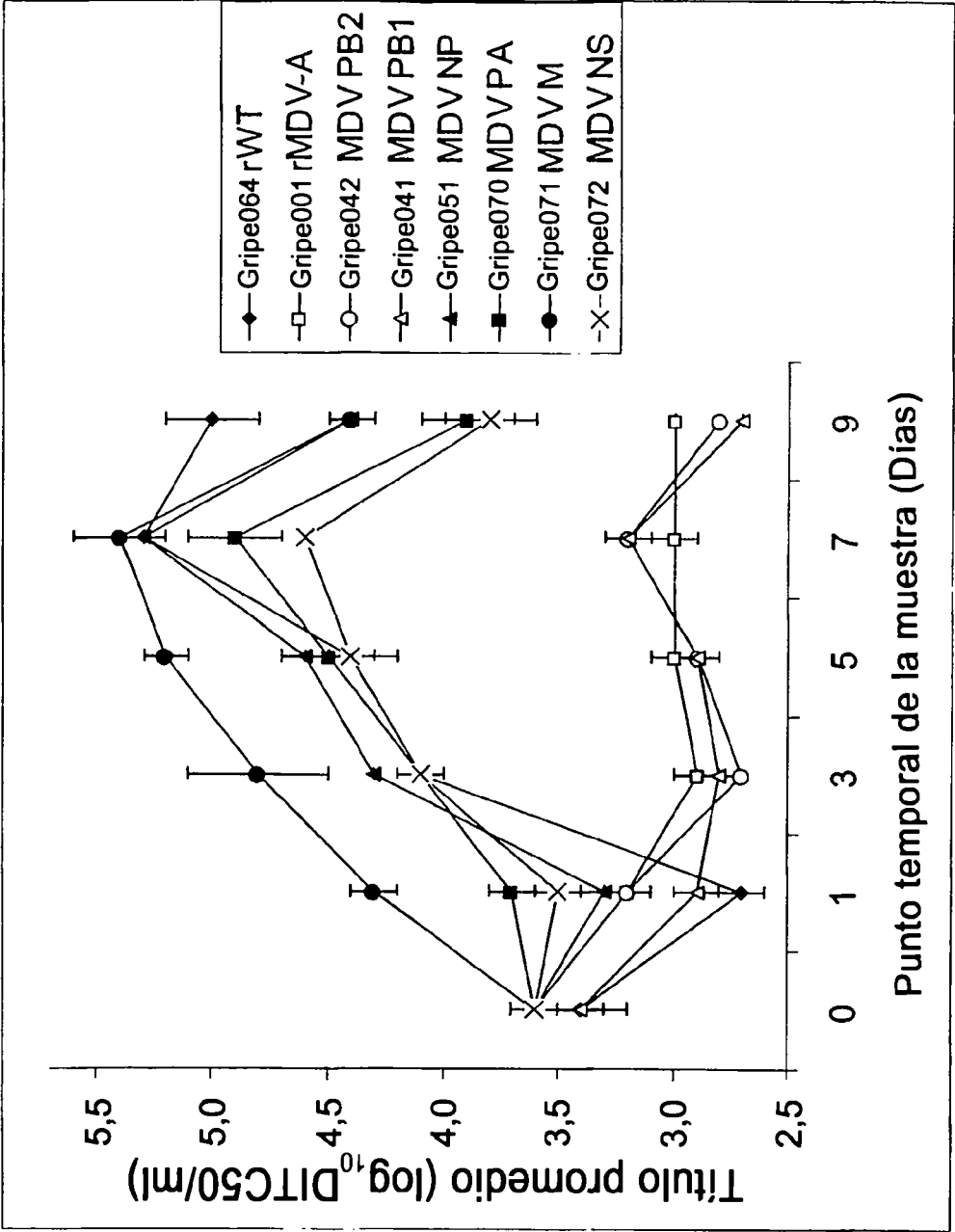


Fig. 20B

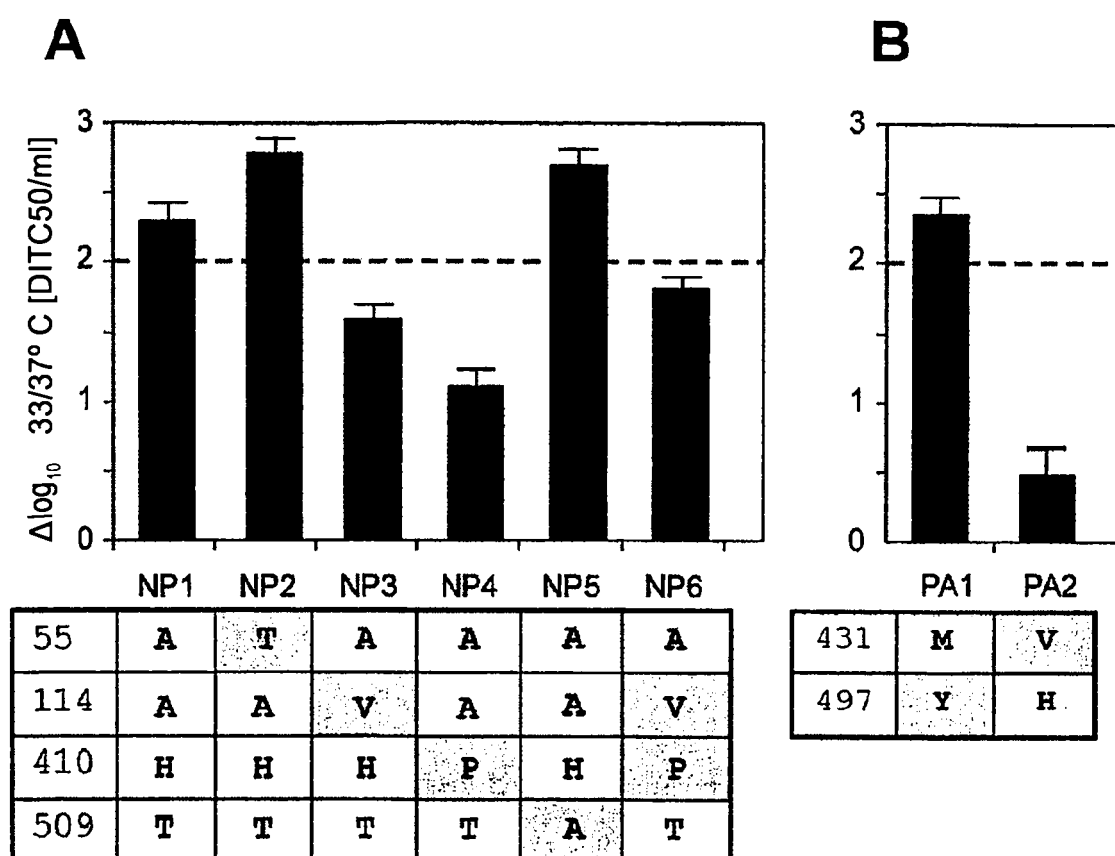
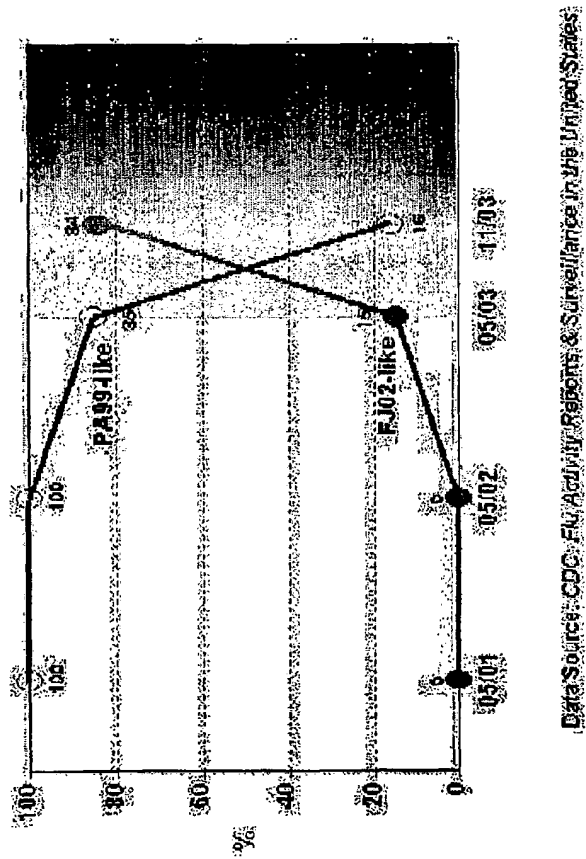


Fig. 21

Cepas H3N2 antigénicamente derivadas produjeron un brote de gripe en la estación 2003-2004



La gripe estacional comenzó extraordinariamente pronto, desde octubre de 2003

Mortalidad: 10,3 % P e I en EE.UU.

144 muertes asociadas a gripe a los 18 años y en individuos más jóvenes

Gripe A predominante (99,4 %), la mayoría cepas H3N2

La vacuna contra la gripe no fue efectiva (MMWR 16 de Junio de 2004)

Fig. 22

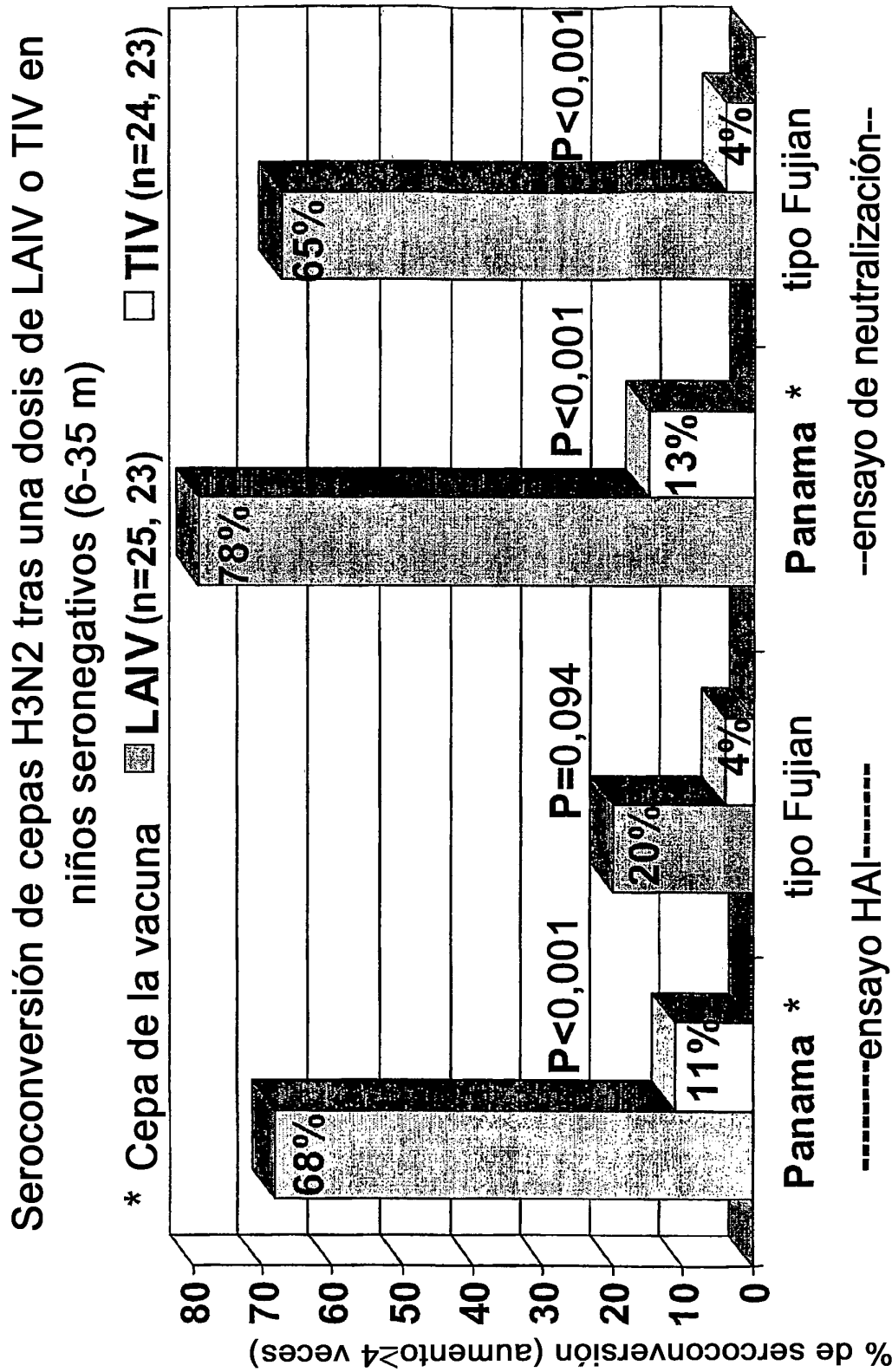


Fig. 23

Generación mediante plásmidos de vacunas de la gripe atenuadas vivas adaptadas al frío

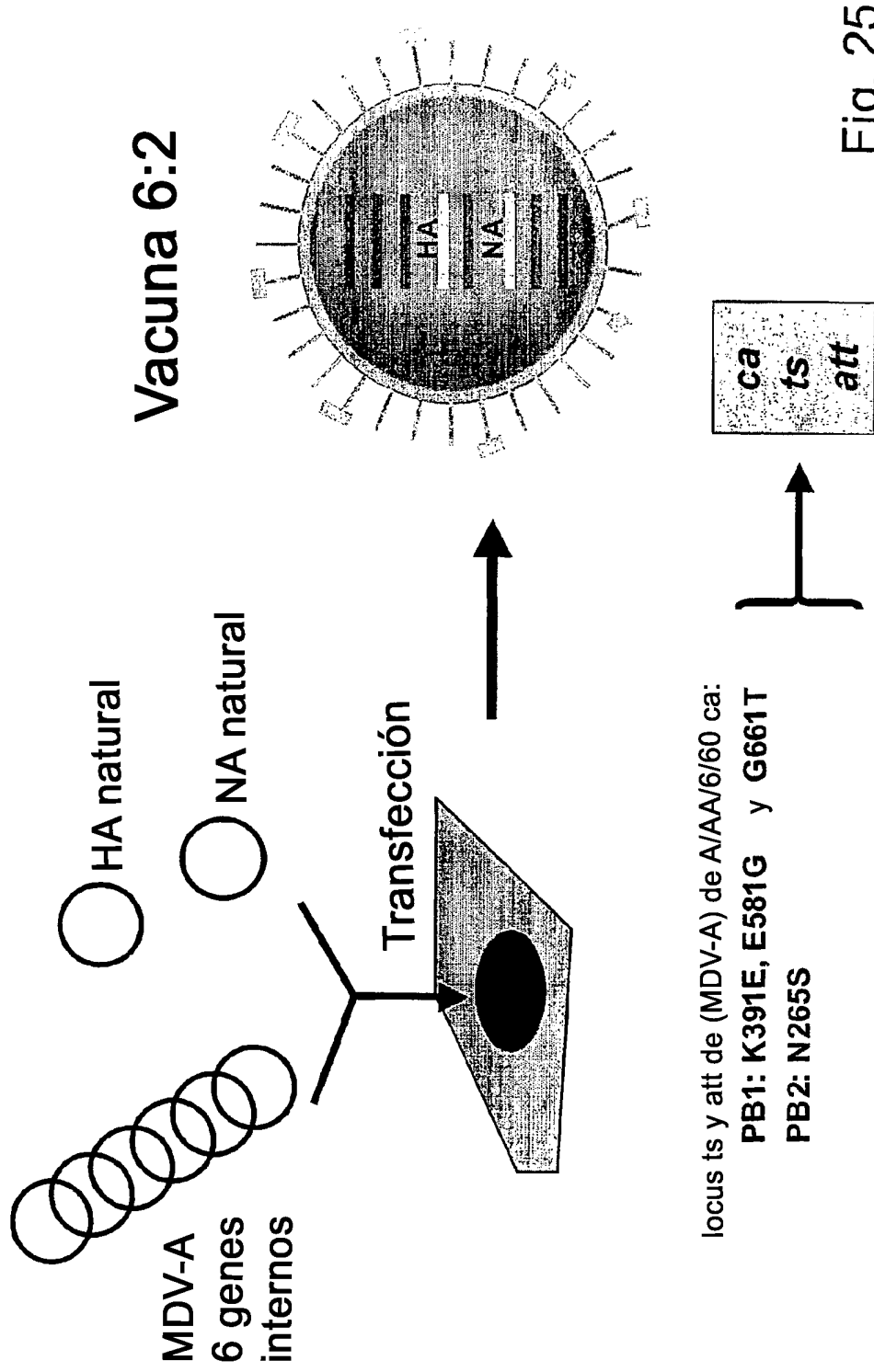


Fig. 25

Base molecular de la deriva antigénica de los virus
del tipo A/Fujian/02 epidémicos

Emplazamiento Ag	C	E	E	A	B	B	B	D	Crecimiento en huevo
21 25 50	75	83	128	131	155,6	183	186	202 219 222,5,6	
A/Panamá/99	S	L	R	H	E	T	A	H Q L S V S WGV	Sí
A/Wyoming/03	P	I	G	Q	K	A	T	H H V I Y RDI	Sí
• Gripe 274			G	Q	K				Sí
• Gripe 275					T			RDI	Sí
• Gripe 276				T	T	H		RDI	Sí
• Gripe 277				T					Sí
• Gripe 278								RDI	Sí
• Gripe 279						H	V		No Sí (HA-V182F)
• Gripe 280					T	H			No Sí (HA-P185L)

Fig. 26

117



117

Mínimo cambio genético para la deriva antigénica de las cepas H3N2 epidémicas

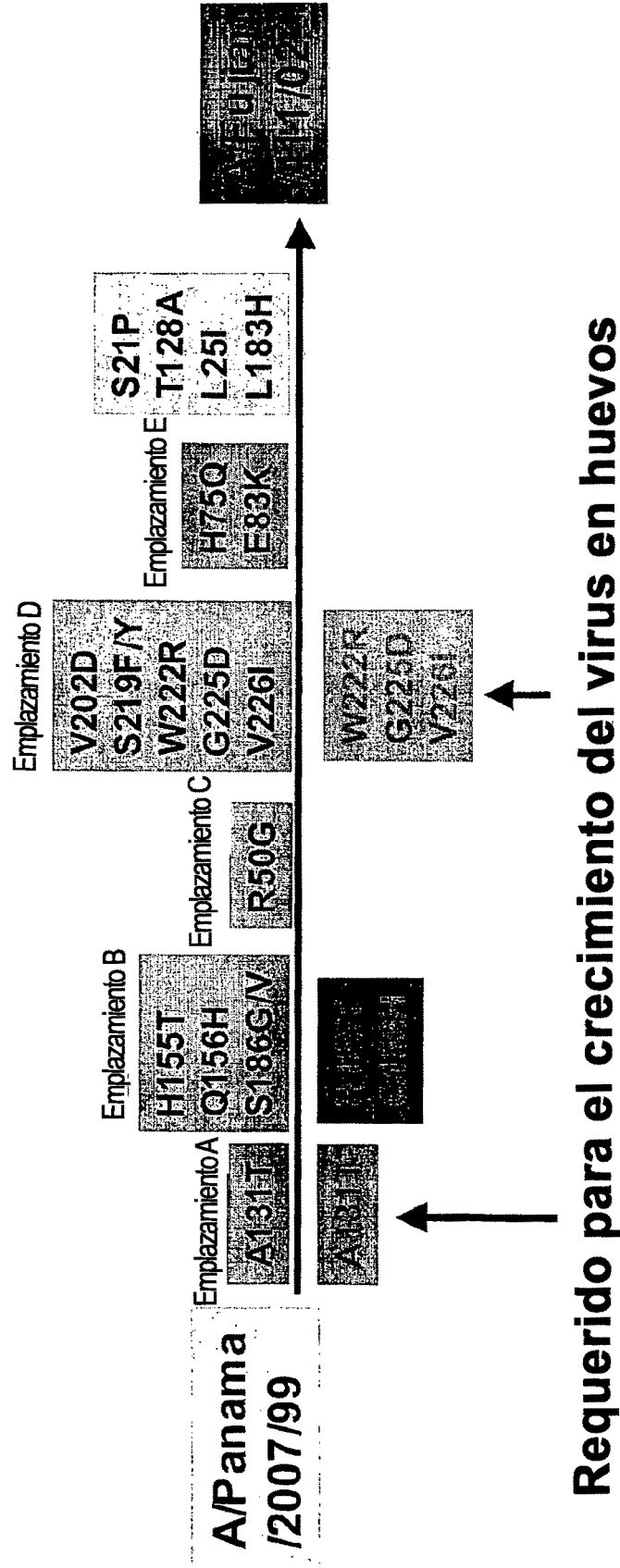


Fig. 28

Características de las cepas del tipo A/Fujian/411/2002

Cepa de	A/Sendai	A/Fujian	A/Wyoming ⁽¹⁾
Virus	H/F 4962/02	/411/02	/03/03
Aisladas	12/4/02	8/11/02	2/13/04
Pasos	CXE8/E2	C1/C1	spPCK2E2/E8
Crecimiento en huevo	Sí	No	Sí
Hocico de hurón	Malo	ND	Bueno

T

G

S

V

T

G

S

V

Q⁽²⁾

↑

E

Q

H

E

Q

H

HA

128

186

219

226

NA

119

136

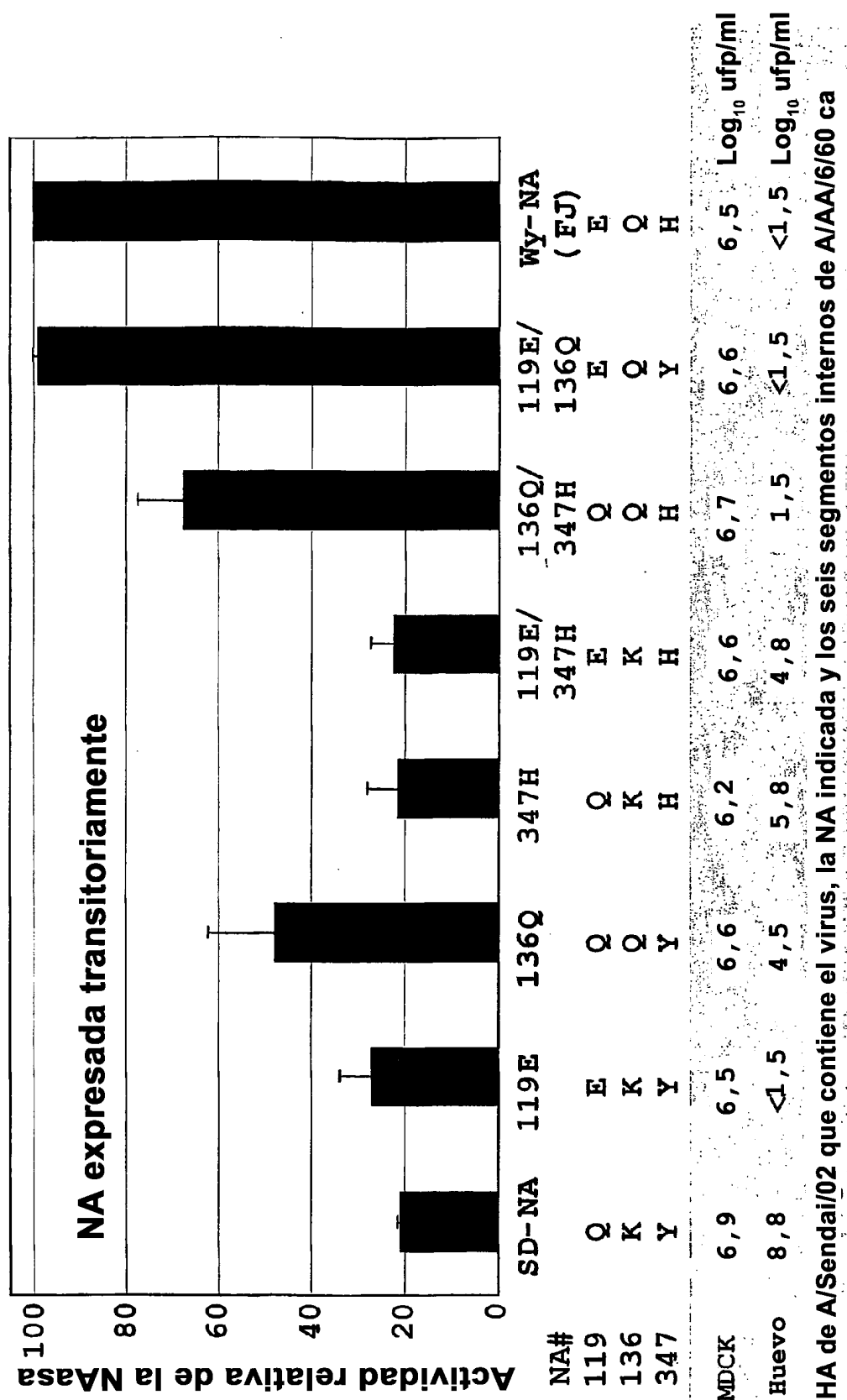
347

⁽¹⁾ Cepa de Vacuna para 2004-2005

⁽²⁾ Emplazamiento resistente a los inhibidores de la neuraminidasa

Fig. 29

Fig. 30 **Actividades de la neuraminidasa NA y replicación vírica**



119E y 136Q son críticos para la actividad de la NA

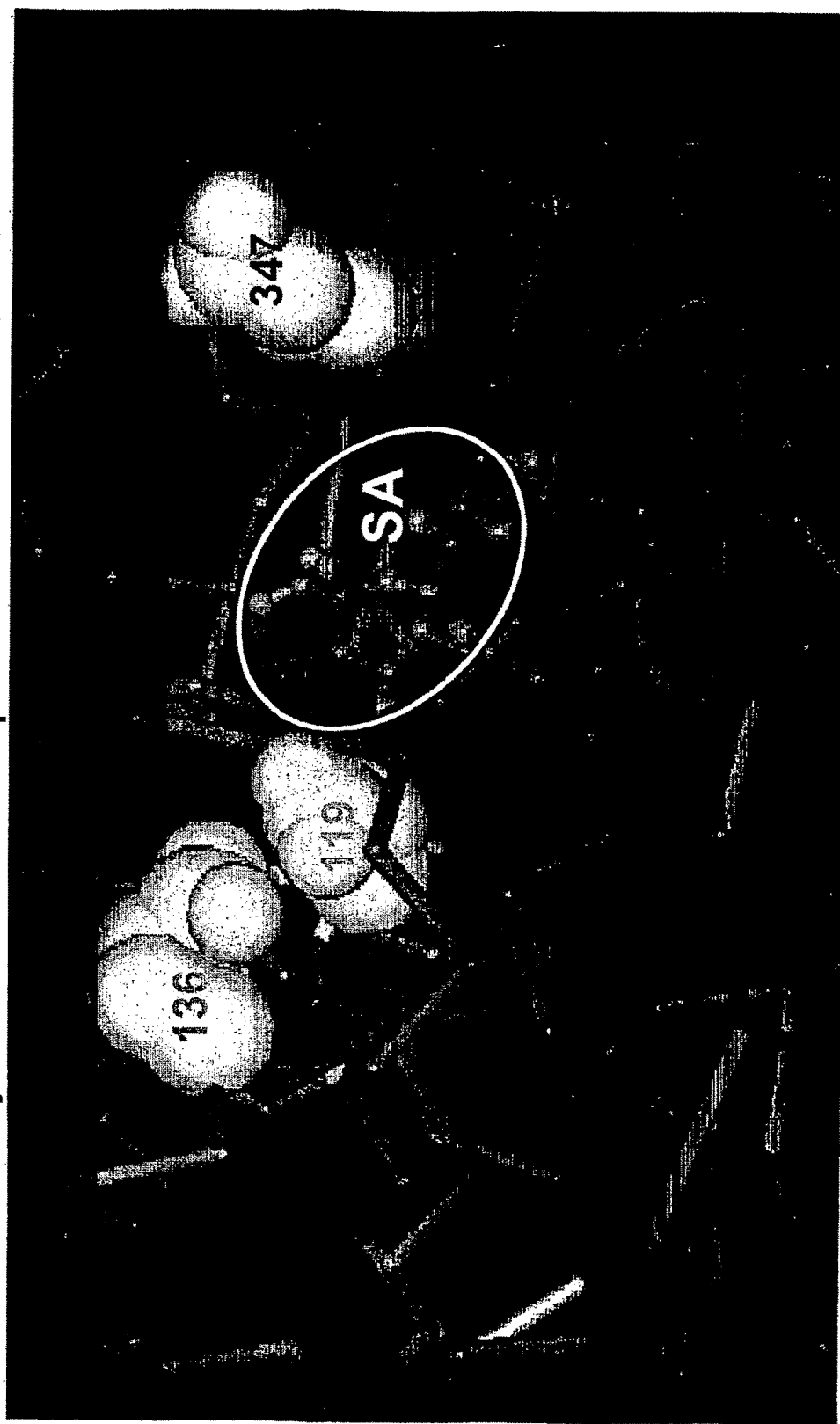


Fig. 31

Efecto de los restos de HA sobre la replicación vírica en huevos

NA \ HA				Wy-NA 119E/136Q /347H	119E/136Q
128	186	219	226		
T	G	S	V	<1,5	<1,5
T	V	S	V	4,95	4,39
T	G	S	I	5,20	3,85
T	V	S	I	7,38	7,30
T	V	Y	I	7,40	7,40
A	V	Y	I	7,75	7,18

Cuatro restos: HA-186V, 226I y HA-119E, 136Q son suficientes para restaurar la replicación vírica en huevos

Fig. 32

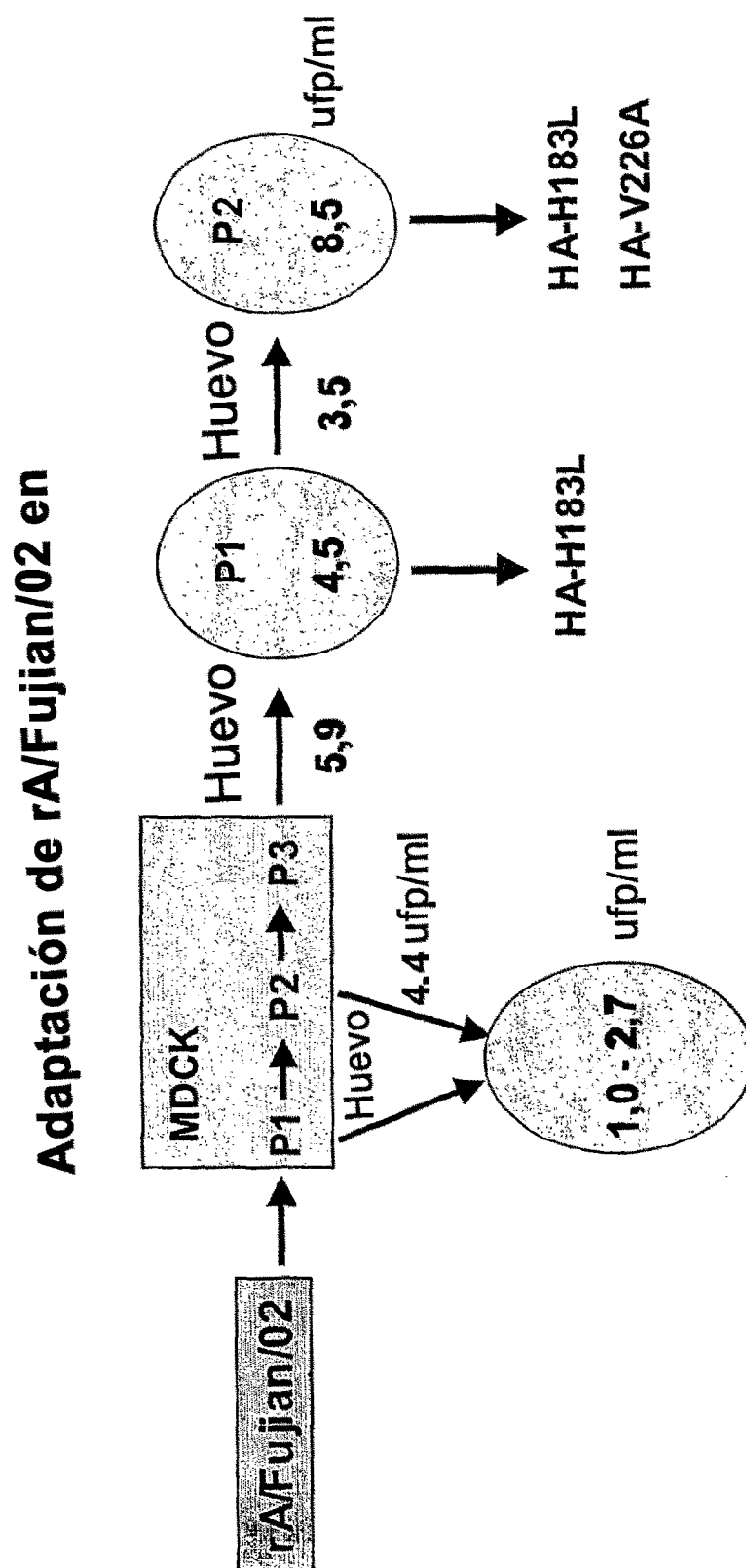


Fig. 33

Emplazamientos de unión al receptor de la HA

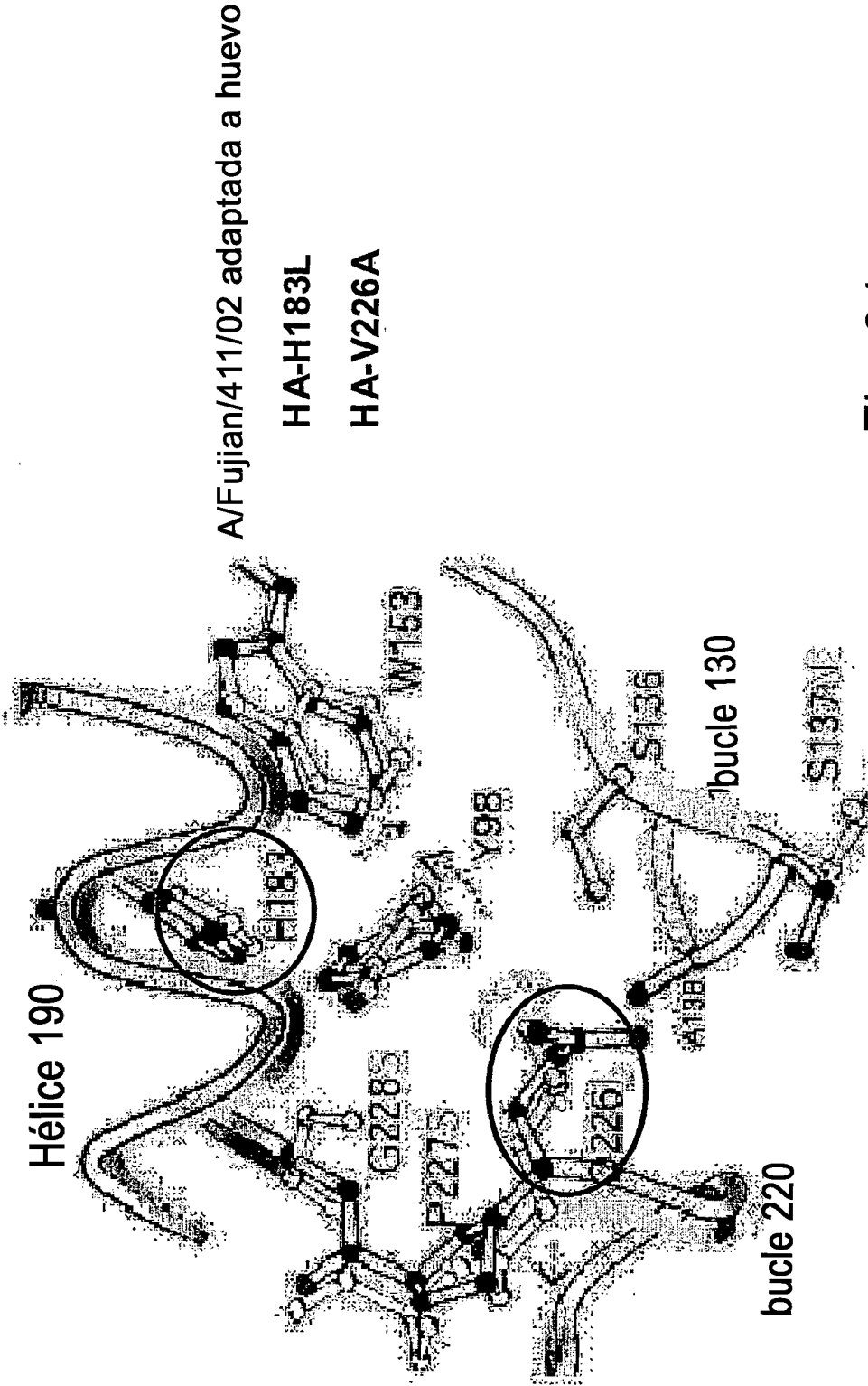


Fig. 34

Ha y col. Virology: 209-218, 2003

El equilibrio entre las actividades de la HA y la NA es crítico para la replicación del virus de la gripe

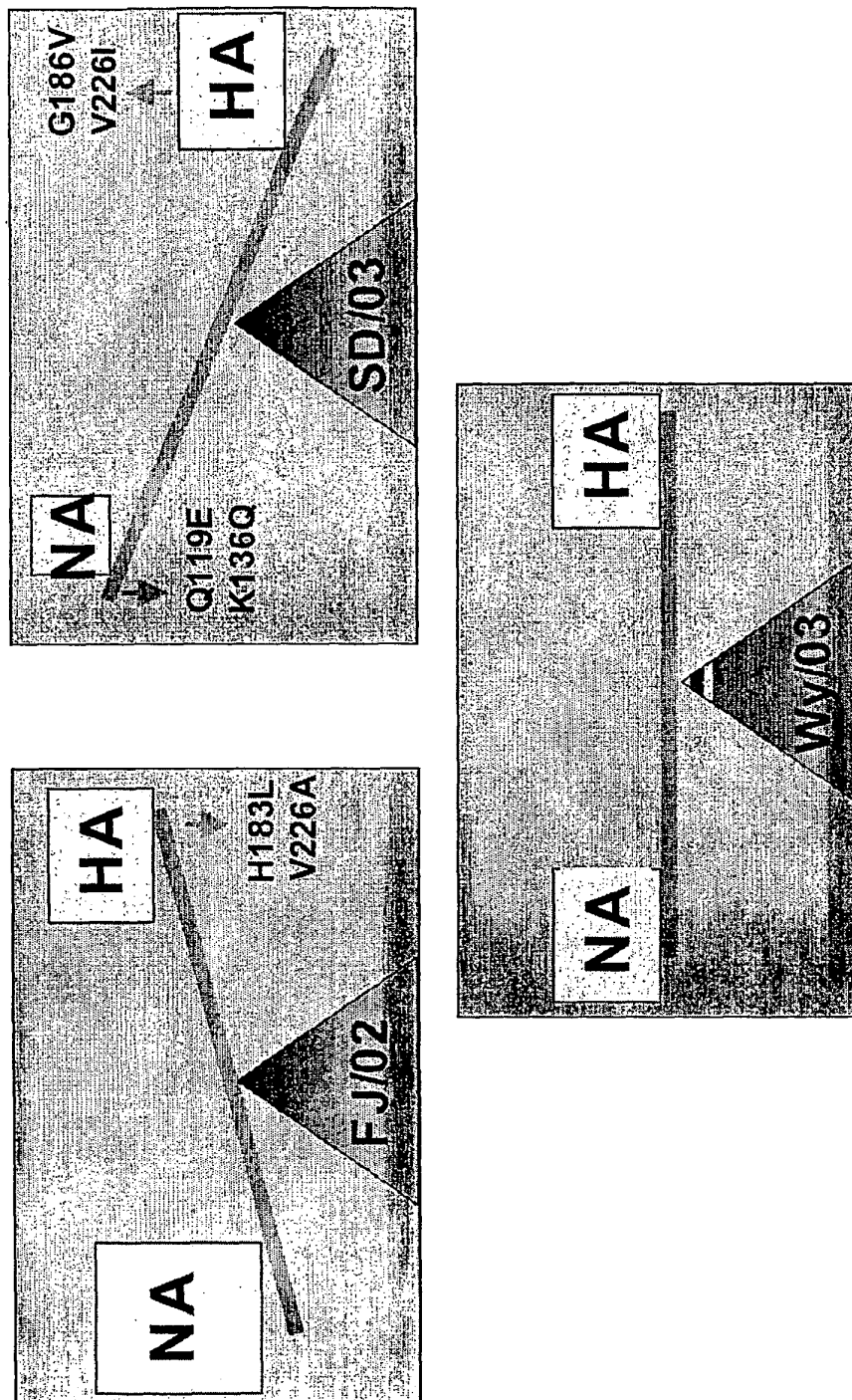


Fig. 35

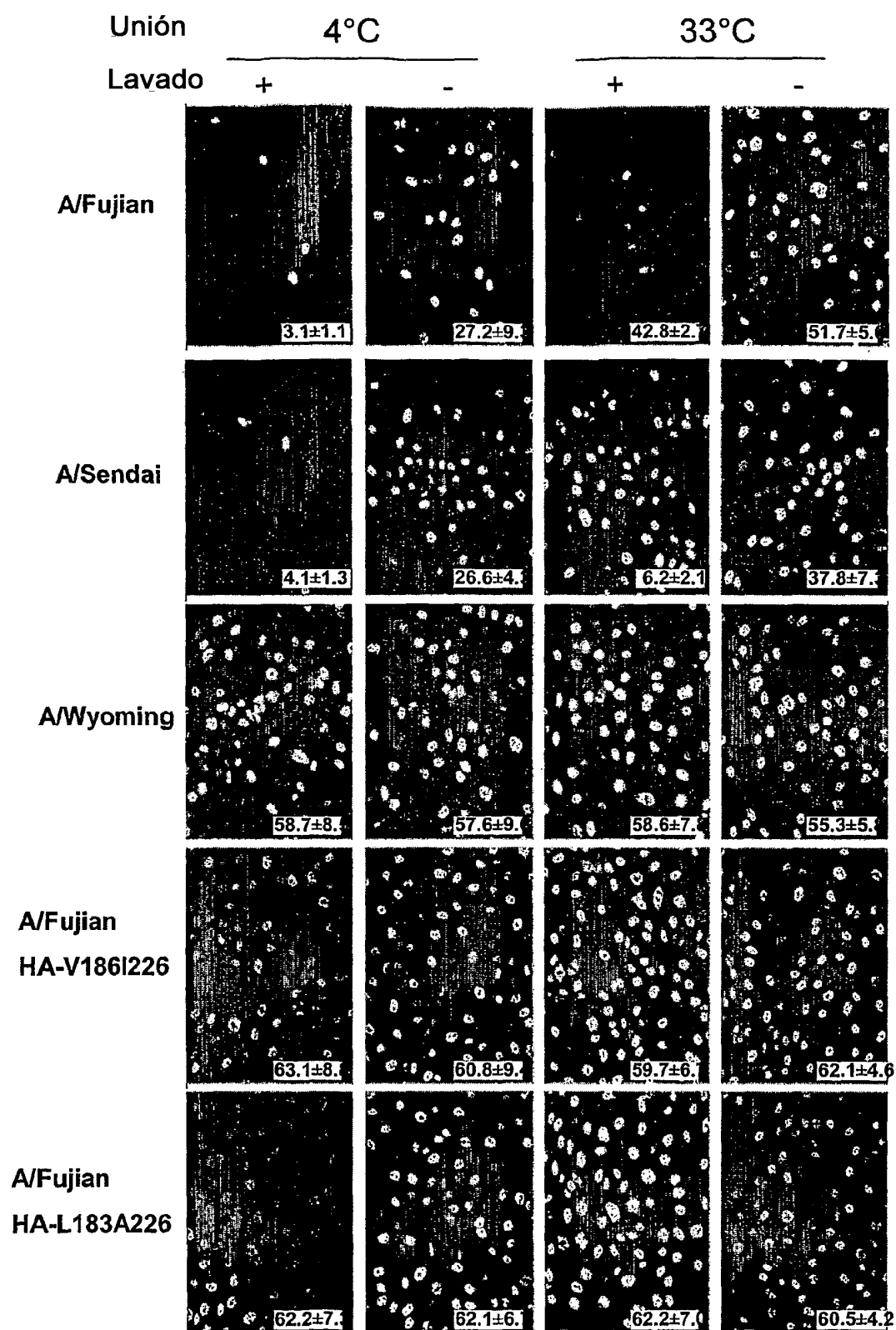


Fig. 36

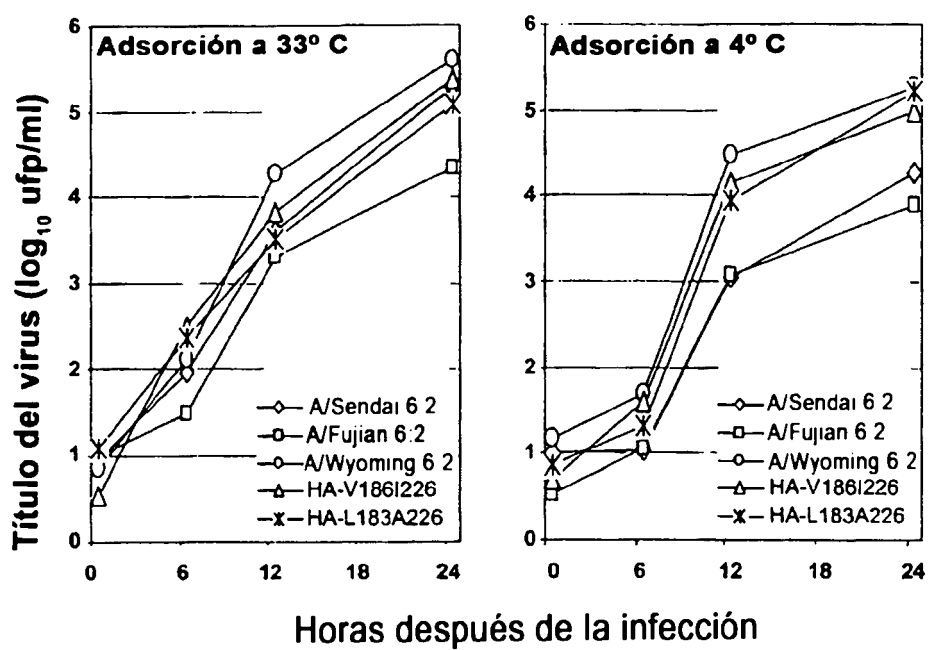


Fig. 37

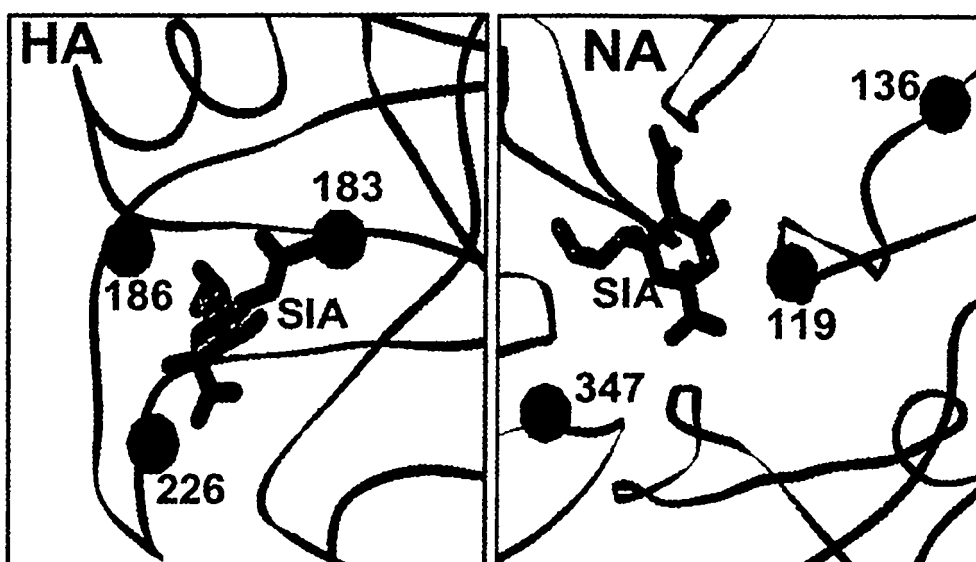


Fig. 38

ES 2 345 492 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> MedImmune Vaccines, Inc., y col.	
5	<120> SISTEMA MULTIPLÁSMIDO PARA LA PRODUCCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE	
	<130> PC/P144766EP	
	<140> A asignar	
	<141> 22-12-2004	
10	<150> 60/532.164	
	<151> 23-12-2003	
	<160> 98	
15	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
	<211> 50	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos poliA.1	
25	<400> 1	
	aacaattgag atctcgggtca ccatagacat gataagatac attgatgagt	50
30	<210> 2	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos poliA.2	
40	<400> 2	
	tataactgca gactagtgat atccttggtt attgcagctt ataatggta	50
45	<210> 3	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
	<400> 3	
55	cacttatatt cacctgcctc agggagcgaa agcaggtc	38
	<210> 4	
60	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	

ES 2 345 492 T3

	<400> 4	
	tattcgtctc agggagcgaag agcaggcaa	30
5	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
15	<400> 5	
	tattcgtctc agggagcgaag agcaggtagt	30
20	<210> 6	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
30	<400> 6	
	tattcgtctc agggagcaaa agcaggtagt a	31
35	<210> 7	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
45	<400> 7	
	cacttatatt cacctgcctc agggagcaaa agcagggg	38
50	<210> 8	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
60	<400> 8	
	tattcgtctc agggagcaaa agcaggagtg a	31
65	<210> 9	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 345 492 T3

	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A		
5	<400>		
	attcgtctc agggagcaaa agcaggtaga t		31
10	<210> 10		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A		
	<400> 10		
20	tattcgtctc agggagcaaa agcagggtga		30
	<210> 11		
25	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A		
	<400> 11		
35	cctaacatat cacctgcctc gtattagtag aaacaaggtc gttt		44
	<210> 12		
40	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A		
	<400> 12		
50	atcgtctc gtattagtag aaacaaggca ttt		33
	<210> 13		
	<211> 33		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A		
	<400> 13		
65	atcgtctc gtattagtag aaacaaggta ctt		33
	<210> 14		
	<211> 33		

ES 2 345 492 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
	<400> 14	
10	atatcgcttc gtattagtag aaacaagggtt att	33
	<210> 15	
	<211> 43	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
	<400> 15	
25	cctaacatat cacctgcctc gtattagtag aaacaagggt gtt	43
	<210> 16	
	<211> 33	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
35	<400> 16	
40	atatcgcttc gtattagtag aaacaaggag ttt	33
	<210> 17	
	<211> 33	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
50	<400> 17	
	atatcgcttc gtattgtag aaacaaggta gtt	33
55	<210> 18	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR-RT de MDV-A	
65	<400> 18	
	atatcgcttc gtattagtag aaacaagggt gtt	33

ES 2 345 492 T3

	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
10	<400> 19	
	gcaagctgtg gaaatatgca aggc	24
15	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
25	<400> 20	
	gccttgcata ttccacagc ttgc	24
30	<210> 21	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
40	<400> 21	
	gaagtgccta cgggcaatct tcaaac	26
45	<210> 22	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
55	<400> 22	
	gtttgaagat tgcccgtag cacttc	26
60	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	

ES 2 345 492 T3

	<400> 23	
	cctgaggagg tcagtaa ac	22
5	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
15	<400> 24	
	gtgtttcact gacctctca gg	22
20	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
30	<440> 25	
	gtttgttagg actctattcc aac	23
35	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 26	
45	gttggaatag agtcctaaca aac	23
	<210> 27	
50	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 27	
60	gacagtaagc tccgaacaca aatac	25
	<210> 28	
	<211> 24	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 345 492 T3

	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
5	<400> 28		
	gtatttgtgt tcggagcttc atgc		24
10	<210> 29		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 29		
20	cgaaccgaac ggctacattg aggg		24
	<210> 30		
25	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 30		
35	cctcaatgt agccgttcgg ttcg		24
	<210> 31		
40	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 31		
50	cagagaaggt agattgacg actg		24
	<210> 32		
	<211> 25		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 32		
	cagtcgtcaa agtcacctt ctctg		25
65	<210> 33		
	<211> 23		

ES 2 345 492 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 33	
10	cactgaccca agacttgagc cac	23
	<210> 34	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 34	
25	gtggctcaag tcttgggtca gtg	23
	<210> 35	
	<211> 26	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
35	<400> 35	
	caaagattaa aatgaaatgg ggaatg	26
40	<210> 36	
	<211> 26	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
50	<400> 36	
	cattccccat ttcattttaa tctttg	26
55	<210> 37	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
65	<400> 37	
	gtacctgtt tctactaata acccgg	26

ES 2 345 492 T3

	<210> 38	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
10	<400> 38	
	ccgggttatt agtagaaaca aggtac	26
15	<210> 39	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
25	<400> 39	
	ggaacactg agaactgtga gacc	24
30	<210> 40	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
40	<400> 40	
	ggtctcacag ttctcaagtg ttcc	24
45	<210> 41	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 41	
55	gaattttatc acaaatgtga tgatgaatg	29
60	<210> 42	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	

ES 2 345 492 T3

	<400> 42	
	cattcatcat cacatttggtg ataaaattc	29
5	<210> 43	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
15	<400> 43	
	gccagaatgc aactgaaatc agagc	25
20	<210> 44	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
30	<400> 44	
	gctctgattt cagtttcatt ctggc	25
35	<210> 45	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 45	
45	ccgaatgaga atccagcaca caag	24
	<210> 46	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 46	
60	cttgtgtgct ggatttcat tcgg	24
	<210> 47	
	<211> 28	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 345 492 T3

	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
5	<400> 47		
	catcaatttc atgcctatat aagctttc		28
10	<210> 48		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 48		
20			
	gaaagcttat ataggcatga aattgatg		28
	<210> 49		
25	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 49		
35			
	cataatggat cctaacactg tgtcaagc		28
	<210> 50		
40	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 50		
50			
	gcttgacaca gtgtaggat ccattatg		28
	<210> 51		
	<211> 26		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A		
	<400> 51		
65			
	ggagaataga ttcacgaga ttggag		26
	<210> 52		
	<211> 26		

ES 2 345 492 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador de oligonucleótidos para la corrección de la mutación de MDV-A	
	<400> 52	
10	ctccaatctc gatgaatcta ttctcc	26
	<210> 53	
	<211> 38	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
	<400> 53	
25	tattcgtctc agggagcaga agcggagcct ttaagatg	38
	<210> 54	
	<211> 39	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
35	<400> 54	
40	tattcgtctc gargccgttc cttcttcatt gaagaatgg	39
	<210> 55	
	<211> 38	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
50	<400> 55	
	tattcgtctc ggcattcttg tcgcctggga tgatgatg	38
55	<210> 56	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
65	<400> 56	
	atatcgtctc gtattagtag aaacacgagc ctt	33

ES 2 345 492 T3

	<210> 57	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
10	<400> 57	
	tattcgtctc agggagcaga agcggagcgt ttcaagatg	40
15	<210> 58	
	<211> 39	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
25	<400> 58	
	tattcgtctc tctcatttg ctcttttta atattcccc	39
30	<210> 59	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
40	<400> 59	
	tattcgtctc atgagaatgg aaaaactact aataaattca gc	42
45	<210> 60	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
55	<400> 60	
	atcgtctc gtattagtag aaacacgagc att	33
60	<210> 61	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	

ES 2 345 492 T3

	<400> 61	
	tattcgtctc agggagcaga agcgggtgcgt ttga	34
5	<210> 62	
	<211> 37	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
15	<400> 62	
	tattcgtctc ccagggccct ttactgtgc agagtgc	37
20	<210> 63	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
30	<400> 63	
	tattcgtctc tcttgatct accagaaata gggccagac	39
35	<210> 64	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
	<400> 64	
45	atcgtctc gtattagtag aaacagtgc att	33
	<210> 65	
50	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
	<400> 65	
60	tattcgtctc agggagcaga agcagagcat ttctaataat c	41
	<210> 66	
	<211> 37	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 345 492 T3

	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca		
5	<400> 66		
	atcgtctc gtattagtag taacaagagc attttc		37
10	<210> 67		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca		
	<400> 67		
20	tattggtctc agggagcaga agcacagcat ttcttgt		38
	<210> 68		
25	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca		
	<400> 68		
35	atcgtctc gtattagtag aaacaacagc attttt		36
	<210> 69		
40	<211> 41		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca		
	<400> 69		
50	tattcgtctc agggagcaga agcagagcat ctctcaaaa c		41
	<210> 70		
	<211> 39		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca		
	<400> 70		
65	atcgtctc gtattagtag taacaagagc atttttcag		39
	<210> 71		
	<211> 41		

ES 2 345 492 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
	<400> 71	
10	tattcgtctc agggagcaga agcacgcact ttcttaaat g	41
	<210> 72	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
	<400> 72	
25	atcgtctc gtattagtag aaacaacgca cttttccag	40
	<210> 73	
	<211> 40	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
35	<400> 73	
40	tattcgtctc agggagcaga agcagaggat ttgttagtc	40
	<210> 74	
	<211> 38	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de la gripe B/Ann Arbor/1/66 ca	
50	<400> 74	
	atcgtctc gtattagtag taacaagagg atttttat	38
55	<210> 75	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la NP de B/Yamanashi/166/98	
65	<400> 75	
	tattcgtctc agggagcaga agcacagcat ttcttctg	39

ES 2 345 492 T3

	<210> 76	
	<211> 39	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la NP de B/Yamanashi/166/98	
10	<400> 76	
	atategtctc gtattagtag aaacaacagc attttttac	39
15	<210> 77	
	<211> 29	
	<212> ADN	
20	<212> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la NA de B/Yamanashi/166/98	
25	<400> 77	
	tattcgtctc agggagcaga agcagagca	29
30	<210> 78	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para la amplificación de la NA de B/Yamanashi/166/98	
40	<400> 78	
	atategtctc gtattagtag taacaagagc atttt	35
45	<210> 79	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8	
	<400> 79	
55	gaaagaagat tgaagaaatc cgaccgctc	29
60	<210> 80	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8	

ES 2 345 492 T3

	<400> 80	
	gagcggtcgg attcttcaa tctctttc	29
5	<210> 81	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8	
15	<400> 81	
	gaaataaaga aactgtgggg gcaaaccgt tcc	33
20	<210> 82	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8	
30	<400> 82	
	ggaacgggtt tgccccaca gttctttat ttc	33
35	<210> 83	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8	
45	<400> 83	
	gtatgatgct gttacaaca cactcc	28
50	<210> 84	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8	
	<400> 84	
60	ggagtgtgtt gttgaacag catcatat	28
	<210> 85	
65	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 345 492 T3

	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8		
5	<400> 85		
	attgctgcta ggagcatagt gagaagagc		29
10	<210> 86		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótidos para introducir mutaciones ts en los genes PB1 y PB2 de PR8		
	<400> 86		
20	gctcttctca ctatgctcct agcaagcaat		29
	<210> 87		
25	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de HA y NA		
	<400> 87		
35	tattcgtctc agggagcaga agcagagca		29
	<210> 88		
40	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de oligonucleótidos para la PCR-RT de HA y NA		
	<400> 88		
50	atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttt		35
	<210> 89		
	<211> 23		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> cebador de oligonucleótidos para la extensión del cebador		
	<400> 89		
65	atgttcttta cgatgcgatt ggg		23
	<210> 90		
	<211> 2836		

ES 2 345 492 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> pAD3000

<400> 90

10	ctagcagtta accggagtag tggtagacct ccgaagttgg gggggaggag acggtaccgt	60
	ctccaataac ccggcggccc aaaatgccga ctccggagcga aagatatacc tcccccgagg	120
15	ccgggaggtc gcgtcaccga ccacgccgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg	180
	tccccaaaaa cgccaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggtagacct	240
	caggacacac gcgggagcag cgcggggccg gggacgccct cccggcggtc acctcagaca	300
20	tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct	360
	ttattttgtga aattttgtgat gctattgctt tattttgtaac cattataagc tgcaataaac	420
25	aaggatctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgag tattgggcgc	480
	tcttccgctt cctcgcctac tgactcgcgtg cgcctcggtc ttcggctgag gcgagcggta	540
	tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag	600
30	aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg	660
	tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgcgcgtc aagtcagagg	720
	tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg	780
35	cgctctcctg ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga	840
	agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc	900
40	tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt	960
	aactatcgtc ttgagtccta cccggtgaaga cagacttat cgcactggc agcagccact	1020
	ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgta cagagttctt gaagtggtag	1080
45	cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtagctt gcgctctgct gaagccagtt	1140
	accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg	1200
50	ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct	1260
	ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tgggaacgaaa actcacgcta agggattttg	1320
	gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtgtt	1380
55	aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtagtaga gttaccaatg cttaatcagt	1440
	gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcattca tagttgcctg actccccgtc	1500
60	gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg	1560

65

ES 2 345 492 T3

	cgagacccac gctcaccggc tccagartta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc	1620
	gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg	1680
5	gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca	1740
	ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga	1800
10	tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct	1860
	ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg	1920
	cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca	1980
15	accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttggcc ggcgtcaata	2040
	cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct	2100
	tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact	2160
20	cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa	2220
	acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc	2280
	atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga	2340
25	tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga	2400
	aaagtgccac ctgacgtcga tatgccaaat acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	2460
30	tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac	2520
	atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg	2580
	cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	2640
35	agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca	2700
	ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggagggtc atataagcag agctctctgg	2760
	ctaactagag aaccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctatagggag	2820
40	accaagctg ttaacg	2836
	<210> 91	
45	<211> 2369	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la gripe de tipo B	
50	<400> 91	
	agcagaagcg gagcctttaa gatgaatata aatccttatt ttctcttcat agatgtaccc	60
	atacaggcag caatttcaac aacattccca tacaccgggtg ttccccctta ttcccatgga	120
55	acgggaacag gctacacaat agacaccgtg attagaacac atgagtactc aaacaagggga	180
	aaacaatata tttctgatgt tacaggatgt gcaatggtag atccaacaaa tgggccatta	240
	cccgaagata atgagccgag tgcctatgca caattggatt gcgttctgga ggctttggat	300
60	agaatggatg aagaacatcc aggtctgttt caagcagcct cacagaatgc catggaggca	360
	ctaattggtca caactgtaga caaattaacc caggggagac agacttttga ttggacagtg	420
65	tgcagaaacc aacctgctgc aacggcactg aacacaacaa taacctcttt taggttgaat	480
	gatttgaatg gagccgacaa ggggtggatta gtaccctttt gccaaagatat cattgattca	540

ES 2 345 492 T3

	ttggaca ^a ac	ctgaaatgac	tttcttctcg	gtaaagaata	taaagaaaaa	attgcctgct	600
	aaaaacagaa	agggtttcct	cataaagaga	ataccaatga	aggtaaaaga	cagaataacc	660
5	agagtggaat	acatcaaaag	agcattatca	ttaaacacaa	tgacaaaaga	tgctgaaaga	720
	ggcaaaactaa	aaagaagagc	aattgccacc	gctgggatac	aaatcagagg	gtttgtatta	780
	gtagttgaaa	acttggtctaa	aaatatctgt	gaaaatctag	aacaaagtgg	tttgccagta	840
10	ggtgggaacg	agaagaaggc	caaactgtca	aatgcagtg	ccaaaatgct	cagtaactgc	900
	ccaccaggag	ggatcagcat	gacagtgaca	ggagacaata	ctaaatggaa	tgaatgctta	960
	aatccaagaa	tctttttggc	tatgactgaa	agaataacca	gagacagccc	aatttggttc	1020
15	cgggattttt	gtagtatagc	accggtcttg	ttctccaata	aaatagccag	attgggaaaa	1080
	gggttcatga	taacaagcaa	aacaaaaaga	ctgaaggctc	aaataccttg	tcccgatctg	1140
	tttaatatac	cattagaaag	atataatgaa	gaaacaagg	caaaattaaa	aaagctgaaa	1200
20	ccattcttca	atgaagaagg	aacggcatct	ttgtcgcctg	ggatgatgat	gggaatgttt	1260
	aatatgctat	ctaccgtgtt	gggagtagcc	gcactaggga	tcaaaaacat	tggaaacaaa	1320
25	gaatacttat	gggatggact	gcaatcttct	gatgattttg	ctctgtttgt	taatgcaaaa	1380
	gatgaagaga	catgtatgga	aggaataaac	gattttttacc	gaacatgtaa	gctattggga	1440
	ataaacatga	gcaaaaagaa	aagtactgt	aatgaaactg	gaatgtttga	atttacaagc	1500
30	atgttctaca	gagatggatt	tgtatcta	tttgcaatgg	aacttccttc	atttggaagt	1560
	gctggagtaa	atgaatcagc	agatatggca	ataggaatga	caataataaa	gaacaatatg	1620
	atcaacaatg	ggatgggtcc	agcaacagca	caaacagcca	tacaattatt	catagctgat	1680
35	tatagataca	cctacaaatg	ccacagggga	gattccaaag	tggaaggaaa	gagaatgaaa	1740
	attataaagg	agctatggga	aaacactaaa	ggaagagatg	gtctgttagt	agcagatggt	1800
	gggcctaaca	tttacaattt	gagaaacttg	catatcccag	aaatagtatt	aaagtacaac	1860
40	ctaattggacc	ctgaatacaa	agggcgggta	ctgcatcctc	aaaatccctt	tgtaggacat	1920
	ttgtctattg	agggcaccaa	agaggcagat	ataaccccag	cacatgggtcc	agtaaagaaa	1980
	atggactatg	atgcggtatc	tggaactcat	agttggagaa	ccaaaaggaa	cagatctata	2040
45	ctaaacactg	atcagaggaa	catgattctt	gaggaacaat	gctacgctaa	gtgttgcaac	2100
	ctttttgagg	cctgttttaa	cagtgcacat	tacaggaaac	cagtaggtca	gcacagcatg	2160
	cttgaggcta	tggcccacag	attaagaatg	gatgcacgac	tagattatga	atcaggaaga	2220
50	atgtcaaagg	atgattttga	gaaagcaatg	gctcaccttg	gtgagattgg	gtacatatata	2280
	gcttcgaaga	tgtctatggg	gttattggtc	atcattgaat	acatgcggta	cacaaatgat	2340
55	taaaatgaaa	aaaggctcgt	gtttctact				2369

<210> 92

60 <211> 2396

<212> ADN

<213> Virus de la gripe de tipo B

65

ES 2 345 492 T3

<400> 92

5	agcagaagcg gagcgttttc aagatgacat tggccaaaat tgaattgtta aaacaactgt	60
	taagggacaa tgaagccaaa acggtattga aacaaacaac ggtagaccaa tataacataa	120
	taagaaaatt caatacatca agaattgaaa agaacccttc attaaggatg aagtgggcca	180
10	tgtgttctaa ttttcccttg gctctgacca agggtgatat ggcaaataga atcccccttg	240
	aatacaaggg aatacaactt aaaacaaatg ctgaagacat aggaacccaa ggccaaatgt	300
	gctcaatagc agcagttacc tgggtggaata catatggacc aataggagat actgaagggt	360
15	tcgaaaaggt ctacgaaagc ttttttctca gaaagatgag acttgacaat gccacttggg	420
	gccgaataac ttttggccca gttgaaagag tgagaaaaag ggtactgcta aaccctctca	480
	ccaaggaaat gcctccagat gaagcgagca atgtgataat ggaaatattg ttccttaaag	540
20	aagcaggaat accaagagaa tctacttggg tacataggga actgataaaa gaaaaaagag	600
	aaaaattgaa aggaacgatg ataactccca ttgtactggc atacatgctt gagagagaac	660
25	tggttgcccg aagaagggtc ctgccagtgg caggagcaac atcagccgag ttcatagaaa	720
	tgctacactg cttacaaggt gaaaattgga gacaaatata tcaccagga ggggaataaac	780
	taactgaatc taggtctcaa tcaatgattg tagcttgtag aaaaataatc agaagatcaa	840
30	tagtcgcatc aaacccta gagctagctg tagaaattgc aaacaagact gtgatagata	900
	ctgaaccttt aaaatcatgt ctggcagcca tagacggagg tgatgtagcc tgtgacataa	960
	taagagctgc attaggacta aagatcgagc aaagacaaag atttggacgg cttgaactaa	1020
35	agagaatatc aggaagagga ttcaaaaatg atgaagaaat attaatcggg aacggaacaa	1080
	tacagaaaat tggaatatgg gacggagaag aggagtcca tgtaagatgt ggtgaatgca	1140
40	ggggaatatt aaaaaagagc aaaatgagaa tggaaaaact actaataaat tcagccaaaa	1200
	aggaggacat gaaagattta ataactttgt gcatggtatt ttctcaagac actaggatgt	1260
	tccaaggagt gagaggagaa ataaattttc ttaatcgagc aggccaaact ttatctccaa	1320
45	tgtaccaact ccagcgatat tttttgaata ggagcaacga cttttttgat caatgggggt	1380
	atgaggaatc acccaaagca agtgaactac atgggataaa tgaattaatg aatgcatctg	1440
	actatacggt gaaaggggtt gtagtaacaa aaaatgtgat tgatgacttt agttctactg	1500
50	aaacagaaaa agtatctata acaaaaaatc ttagtttaat aaaaaggact ggggaagtca	1560
	taatgggggc taatgacgta agtgaattag aatcacaagc acagctaata ataacatatg	1620
55	atacacctaa gatgtgggag atgggaacaa ccaaagaact ggtgcaaac acctaccaat	1680
	gggtgctaaa aaatttggtg acactgaagg ctgagtttct tctgggaaaa gaagacatgt	1740
	tccaatggga tgcatttgaa gcatttgaaa gcataatccc ccagaagatg gctggccagt	1800
60	acagtggatt tgcaagagca gtgctcaaac aaatgagaga ccaagagggt atgaaaactg	1860
	accagttcat aaagtgtgtg cttttctgtt tctcaccacc aaaattaagg agaaatgggg	1920
65	agccttatca attcttgagg cttatgttga agggaggagg ggaaaatttc atcgaagtaa	1980

ES 2 345 492 T3

	ggaaagggct ccctctattc tcctacaatc cacaacacaga agtcctaact atatgcgga	2040
	gaatgatgtc attaaaagga aaaattgaag atgaagaaag gaatagatca atggggaatg	2100
5	cagtattggc aggcctttctc gttagtggca agtatgaccc agatcttga gatttcaaaa	2160
	ctattgaaga acttgaaaag ctaaaaccgg gggaaaaagc aaacatctta ctttatcaag	2220
	gaaagcccg taaagtagtt aaaaggaaaa gatatagtgc tttatccaat gacatttcac	2280
10	aaggaattaa gagacaaaga atgacagttg agtccatggg gtgggccttg agctaataa	2340
	aatttatcca ttaattcaat agacacaatt gagtgaaaaa tgctcgtgtt tctact	2396
15	<210> 93	
	<211> 2308	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la gripe de tipo B	
20	<400> 93	
	agcagaagcg gtgcgtttga tttgccataa tggatacttt tattacaaga aacttccaga	60
25	ctacaataat acaaaaggcc aaaaacacaa tggcagaatt tagtgaagat cctgaattac	120
	aaccagcaat gctattcaac atctgcgtcc atctggaggt ctgctatgta ataagtgata	180
	tgaattttct tgatgaagaa ggaaaaacat atacagcatt agaaggacaa ggaaaagaac	240
30	aaaacttgag accacaatat gaagtgattg agggaaatgcc aagaaacata gcatggatgg	300
	ttcaaagatc cttagcccaa gagcatggaa tagagactcc aaggtatctg gctgatttgt	360
35	tcgattataa aaccaagagg tttatagaag ttggaataac aaagggtattg gctgacgatt	420
	acttttgaa aaagaaagaa aagctgggga atagcatgga actgatgata ttcagctaca	480
	atcaagacta ttcgttaagt aatgaatcct cattggatga ggaaggaaaa gggagagtgc	540
40	taagcagact cacagaactt caggctgagt taagtctgaa aaatctatgg caagtctca	600
	taggagaaga agatattgaa aaaggaattg acttcaaact tggacaaaca atatctaaac	660
	taagggatat atctgttcca gctggtttct ccaattttga aggaatgagg agctacatag	720
45	acaatataga tcctaaagga gcaatagaga gaaatctagc aaggatgtct cccttagtat	780
	cagttacacc taaaaagttg aaatgggagg acctaagacc aatagggcct cacatttaca	840
50	accatgagct accagaagtt ccatataatg cctttcttct aatgtctgat gagttggggc	900
	tggctaatat gactgaaggg aagtcacaaga aaccgaagac cttagccaaa gaatgtctag	960
	aaaagtactc aacactacgg gatcaaactg acccaatatt aataatgaaa agcgaaaaag	1020
55	ctaacgaaaa cttcttatgg aagctgtgga gggactgtgt aaatacaata agtaatgagg	1080
	aaacaagtaa cgaattacag aaaaccaatt atgccaaagt ggcacagga gatggattaa	1140
	cataccagaa aataatgaaa gaagtagcaa tagatgacga aacaatgtac caagaagagc	1200
60	ccaaaatacc taacaaatgt agagtggctg cttgggttca aacagagatg aatctattga	1260
	gcaactctgac aagtaaaagg gccctggatc taccagaaat agggccagac gtagcaccca	1320
	tggagcatgt agggagtga agaaggaaat actttgttaa tgaaatcaac tactgtgaagg	1380
65	cctctaccgt tatgatgaag tatgtacttt ttcacacttc attattaaat gaaagcaatg	1440

ES 2 345 492 T3

	ccagcatggg	aaaatataaa	gtaataccaa	taaccaacag	agtagtaa	gaaaaaggag	1500
	aaagttttga	catgcttcat	ggctctggcg	ttaaagggca	atctcatctg	aggggagata	1560
5	ctgatgttgt	aacagttgtg	actttcgaat	ttagtagtac	agatcccaga	gtggactcag	1620
	gaaagtggcc	aaaatatact	gtatttagaa	ttggctcctt	atttgtgagt	ggaagggaaa	1680
10	aatctgtgta	cctatatatg	cgagtgaatg	gtacaaataa	gatccaaatg	aaatggggaa	1740
	tggaagctag	aagatgtctg	cttcaatcaa	tgcaacaaat	ggaagcaatt	gttgaacaag	1800
	aatcatcgat	acaaggatat	gacatgacca	aagcttggtt	caagggagac	agagtgaata	1860
15	gtcccaaaac	tttcagttat	gggactcaag	aaggaaaact	agtaaaagga	tcctttggga	1920
	aagcactaag	agtaatatct	accaaagtgt	tgatgcacta	tgtatttgga	aatgccaat	1980
	tggaaggggt	tagtgccgaa	tctaggagac	ttctactgtt	aattcaggca	ttaaaggaca	2040
20	gaaagggccc	ttgggtattc	gacttagagg	gaatgtattc	tggaatagaa	gaatgtatta	2100
	gtaacaacc	ttgggttaata	cagagtgc	actggtttaa	tgaatggttg	ggctttgaaa	2160
25	aagaggggag	taaagtatta	gaatcaatag	atgaaataat	ggatgaatga	aagaagggca	2220
	tagcgctcaa	tttgggtacta	ttttgttcat	tatgtatcta	aacatccaat	aaaaagaatt	2280
	gagaattaaa	aatgcacgtg	tttctact				2308

30

<210> 94

<211> 1884

35 <212> ADN

<213> Virus de la gripe de tipo B

40

45

50

55

60

65

ES 2 345 492 T3

<400> 94

	agcagaagca gagcattttc taatatccac aaaatgaagg caataattgt actactcatg	60
5	gtagtaacat ccaatgraga tgaatrtgc actgggataa catcgtcaaa ctcaccccat	120
	gtgggtcaaaa ctgctactca aggggaagtc aacgtgactg gtgtgatacc actgacaaca	180
	acacctacca aatctcattt tgcaaatctc aaaggaacac agaccagagg gaaactatgc	240
10	ccaaactgtc tcaactgcac agatctggac gtggccttgg gcagaccaa gtgtatgggg	300
	accatacctt cggcaaaagc ttcaatactc cacgaagtca aacctgttac atctgggtgc	360
	tttctataa tgcacgacag aacaaaaatc agacagctac ccaatcttct cagaggatat	420
15	gaaaatatca ggttatcagc ccgtaacgtt atcaacgcag aaacggcacc aggaggaccc	480
	tacatagtgt gaacctcagg atcttgccct aacgttacca atgggaaagg attcttcgca	540
	acaatggctt gggctgtccc aaaaaacaac aaaacaaaa cagcaacgaa cccattaaca	600
20	gtagaagtac catacatttg tacaaaagga gaagaccaa ttactgtttg ggggttccat	660
	tctgatgacg aaacccaaat ggtaacactc tatggagact cgaagcctca aaagttcacc	720
	tcctctgcca acggagtaac cacacattat gtttctcaga ttggtggctt cccaaatcaa	780
25	acagaagacg aagggtacc acaaaagcgc agaattgttg ttgattacat ggtgcaaaaa	840
	cctggaaaaa caggaacaat tgtctatcaa agaggtgttt tattgcctca aaaagtgtgg	900
30		
	tgcgcaagtg gcaggagcaa ggtaataaaa ggggccttgc ctttaattgg tgaagcagat	960
35	tgcctccacg aaaaatacgg tggattaaac aaaagcaagc cttactacac aggagaacat	1020
	gcaaaagcca taggaaattg cccaatatgg gtgaaaacac cttgaagct ggccaatgga	1080
	accaaataa gacctcctgc aaaactatta aaggaaaggg gtttcttcg agctattgct	1140
40	ggtttcttgg aaggaggatg ggaaggaaatg attgcagggtt ggcacggata cacatctcat	1200
	ggagcacatg gagtggcagt ggcagcagac ctaagagta cgcaagaagc tataaacaag	1260
45	ataacaaaa atctcaattc tttaagttag ctagaagtaa agaattctca aagactaagc	1320
	ggtgcaatgg atgaactcca caacgaaata ctcgagctgg atgagaaagt ggatgatctc	1380
	agagctgata caataagctc gcaaatagag cttgcagtct tgctttccaa cgaaggata	1440
50	ataaacagtg aagatgagca tctcttggca cttgaaagaa aactgaagaa aatgctgggc	1500
	ccctctgctg tagacatagg gaatggatgc ttcgaaacca aacacaaatg caaccagact	1560
	tgcctagaca ggatagctgc tggaccttt aatgcaggag aattttctct tccactttt	1620
55	gattcactaa atattactgc tgcattctta aatgatgatg gattggataa tcatactata	1680
	ctgctctact actcaactgc tgcttctagt ttggctgtaa cattgatgat agctatcttt	1740
60	attgtttata tgggtctccag agacaatgtt tcttgctcca tctgtctata aggaaaatta	1800
	agccctgtat tttcctttat tgtagtgctt gtttgcttgt caccattaca aaaaacgtta	1860
	ttgaaaaatg ctcttggttac tact	1884

65 <210> 95

<211> 1842

ES 2 345 492 T3

<212> ADN

<213> Virus de la gripe de tipo B

5 <400> 95

	agcagaagca cagcattttc ttgtgaactt caagtaccaa caaaaactga aaatcaaaat	60
	gtccaacatg gatattgacg gcatcaacac tggaacaatt gacaaaacac cagaagaaat	120
10	aacttccgga accagtgggg caaccagacc aatcatcaaa ccagcaaccc ttgccccacc	180
	aagcaacaaa cgaacccgaa acccatcccc ggaaagggca gccacaagca gtgaagctga	240
15	tgtcgggaagg agaacccaaa agaaacaaac cccgacagag ataaagaaga gcgtctacaa	300
	tatggtagtg aaactgggtg aattctacaa ccagatgatg gtcaaagctg gactcaacga	360
	tgacatggag agaaacctaa tccaaaatgc acatgctgcg gaaagaattc tattggctgc	420
20	tactgatgac aagaaaactg aattccaaaa gaaaaagaat gccagagatg tcaaagaagg	480
	gaaagaagaa atagaccaca acaaaacagg aggcaccttt tacaagatgg taagagatga	540
25	taaaaccatc tacttcagcc ctataagaat taccttttta aaagaagagg tgaaaacaat	600
	gtacaaaacc accatgggga gtgatgggtt cagtggacta aatcacatca tgattgggca	660
	ttcacagatg aacgatgtct gtttccaaag atcaaaggca ctaaaaagag ttggacttga	720
30	cccttcatta atcagtactt ttgcaggaag cacactcccc agaagatcag gtgcaactgg	780
	tgttgcgatc aaaggaggtg gaactttagt ggcagaagcc attcgattta taggaagagc	840
35	aatggcagac agagggctat tgagagacat cagagccaag acggcctatg aaaagattct	900
	tctgaatctg aaaaacaagt gctctgcgcc ccaacaaaag gctctagttg atcaagtgat	960
40	cggaagtaga aatccagggg ttgcagacat agaagacctt accctgcttg cccgaagcat	1020
	ggtcgttgtc aggccctctg tagcgagcaa agtggtgctt cccataagca tttatgccaa	1080
	aataacctca ctaggggttca atgttgaaga atactctatg gttgggtatg aagccatggc	1140
45	tctttataat atggcaacac ctgtttccat attaagaatg ggagacgatg caaaagataa	1200
	atcacaatta ttcttcatgt cttgcttcgg agctgcctat gaagacctaa gagttttgtc	1260
	tgactaaca ggcacagaat tcaagcatag gtcagcatta aagtgaagg gtttccacgt	1320
50	tccagcaaag gagcaagtgg aaggaatggg ggcagctctg atgtccatca agctccagtt	1380
	ttgggctcca atgaccagat ctggggggaa tgaagtaggt ggagacggag ggtctggtca	1440
55	aataagttgc agccccgtgt ttgcagtaga aagacctatt gctctaagca agcaagctgt	1500
	aagaagaatg ctgtcaatga atattgaggg acgtgatgca gatgtcaaag gaaatctact	1560
	caagatgatg aatgattcaa tgactaagaa aaccaatgga aatgctttca ttgggaagaa	1620
60	aatgtttcaa atatcagaca aaaacaaaac caatcccatt gagattccaa ttaagcagac	1680
	catccccaat ttcttctttg ggaggggacac agcagaggat tatgatgacc tcgattatta	1740
	aagcaacaaa atagacacta tggctgtgac tgtttcagta cgtttggaat gtgggtgttt	1800
65	actttttattg aaataaatgt aaaaaatgct gttgtttcta ct	1842

ES 2 345 492 T3

<210> 96

<211> 1557

<212> ADN

5 <213> Virus de la gripe de tipo B

<400> 96

```

10      agcagaagca gagcatcttc tcaaaactga agcaaataagg ccaaaaatga acaatgctac      60
      cttcaactat acaaacgtta accctatttc tcacatcagg gggagtgtta ttatcactat      120
15      atgtgtcagc ttactgttca tacttattgt attcggatat attgctaaaa ttttcaccaa      180
      caaaaataac tgcaccaaca atgtcattgg attgcgcgaa cgtatcaaat gttcaggctg      240
      tgaaccgttc tgcaacaaaa gagatgacat ttcttctccc agagccggag tggacatacc      300
20      ctcgtttatc ttgccagggc tcaacctttc agaaagcact cctaattagc cctcataggt      360
      tcggagaaac cagaggaaac tcagctccct tgataataag ggaacccttt gttgcttgtg      420
25      gaccaaagga atgcagacac tttgctctaa cccattatgc agctcaacca gggggatact      480
      acaatggaac aagaaaggac agaaacaagc tgaggcatct gatttcagtc aaattaggca      540
      aaatcccaac tgtagaaaac tccattttcc acatggcagc ttggagtggg tccgcatgcc      600
30      atgatggtag agaatggaca tatatcggag ttgatggccc tgacagtaat gcatgatca      660
      aaataaaaata tggagaagca tatactgaca cataccattc ctatgcaaac aacatcctaa      720
35      gaacacaaga aagtgcctgc aattgcatcg ggggagattg ttatcttatg ataactgatg      780

40      gctcagcttc aggaattagt aaatgcagat ttcttaaaat tcgagaggggt cgaataataa      840
      aagaaatatt tccaacagga agagtagagc atactgaaga atgcacatgc gggttcgcca      900
      gcaataaaaac catagaatgt gcctgtagag ataacagtta cacagcaaaa agaccctttg      960
45      tcaaattaaa tgtggagact gatacagctg aaataagatt gatgtgcaca gagacttatt      1020
      tggacacccc cagaccagat gatggaagca taacagggcc ttgcgaatct aatggggaca      1080
      aagggcttgg aggcattcaa ggaggatttg tccatcaaag aatggcatct aagattggaa      1140
50      gatggtactc ccgaacgatg tctaaaactg aaagaatggg gatggaactg tatgtcaagt      1200
      atgatggaga cccatggact gacagtgcg cccttgctcc tagtggagta atggtttcaa      1260
55      tgaaagaacc tggttggtat tcttttggtc tcgaaataaa agataagaaa tgtgatgtcc      1320
      cctgtattgg gatagagatg gtacacgatg gtggaaaaga gacttggcac tcagcagcaa      1380
      cagccattta ctgtttgatg ggctcaggac aattgctatg ggacactgtc acagggtgtg      1440
60      atatggctct gtaatggagg aatggttgaa tctgttctaa accctttgtt cctattttgt      1500
      ttgaacaatt gtccttactg gacttaattg tttctgaaaa atgctcttgt tactact      1557

```

65

ES 2 345 492 T3

<210> 97

<211> 1190

<212> ADN

5 <213> Virus de la gripe de tipo B

<400> 97

10

```

agcagaagca cgcactttct taaaatgtcg ctgtttggag acacaattgc ctacctgctt    60
tcactaacag aagatggaga aggcaaagca gaactagcag aaaaattaca ctgttggttc    120
15 ggtgggaaag aatttgacct agactctgct ttggaatgga taaaaaaca aagatgccta    180
actgatatac aaaaagcact aattggtgcc tctatctgct ttttaaaacc caaagaccaa    240
gaaagaaaaa gaagattcat cacagagccc ctgtcaggaa tgggaacaac agcaacaaaa    300
20 aagaaaggcc tgattctagc tgagagaaaa atgagaagat gtgtgagttt tcatgaagca    360
tttgaaatag cagaaggcca tgaaagctca gcactactat attgtctcat ggcatgtac    420
25 ctgaaccctg gaaattattc aatgcaagta aaactaggaa cgctctgtgc tttatgcgag    480
aaacaagcat cacattcaca aagagctcat agcagagcag caagatcttc agtgcctgga    540
gtgaggcgag aaatgcagat ggtttcagct gtgaacacag caaaaacaat gaatggaatg    600
30 ggggaaggag aagacgtcca aaaactggca gaagagctgc aaagcaacat tggagtattg    660
agatctctgg gggcaagtca aaagaatgga gaaggaattg caaaggatgt aatggaagtg    720
ctaaagcaga gctctatggg aaattcagct cttgtgaaga aataacctata atgctcgaac    780
35 catttcagat tctttcaatt tgttctttca tttatcagc tctccatttc atggcttgga    840
caatagggca tttgaatcaa ataaaaagag gagtaaacct gaaaatacga ataagaaatc    900
40 caaataaaga gacaataaac agagaggtat caattttgag acacagttac caaaaagaaa    960
tccaagccaa agaaacaatg aagggaagtac tctctgacaa catggagata ttgagtgacc   1020
acatagtaat tgaggggctt tctgctgaag agataataaa aatgggtgaa acagtttttg   1080

```

45

50

```

aggtagaaga attgcagtaa acccaatttt caccgtatct cttgctatgc atttaagcaa   1140
attgtaatca atgtcagcaa ataaactgga aaaagtgcgt tgtttctact   1190

```

55

<210> 98

<211> 1098

<212> ADN

60 <213> Virus de la gripe de tipo B

65

ES 2 345 492 T3

<400> 98

5	agcagaagca gaggatttgt ttagtcactg gcaaacggaa aaaaatggcg gacaacatga	60
	ccacaacaca aattgaggta ggtccgggag caaccaatgc caccataaac tttgaagcag	120
	gaattctgga gtgctatgaa aggctttcat ggcaaagagc ccttgactac cctgggtcaag	180
10	accgcctaaa cagactaaag agaaaattag aatcaagaat aaagactcac aacaaaagtg	240
	agcctgaaag taaaaggatg tctcttgaag agagaaaagc aattggggta aaaatgatga	300
	aagtgtctct atttatgaat ccatctgctg gaattgaagg gtttgagcca tactgtatga	360
15	aaaattcctc aaatagcaac tgtccaaact gcaattggac cgattaccct ccaacaccag	420
	gaaagtgcct tgatgacata gaagaagaac cggagaatgt tgatgacca actgaaatag	480
20	tattgagggg catgaacaac aaagatgcaa ggcaaaagat aaaggaggaa gtaaactctc	540
	agaaagaagg gaagtccgt ttgacaataa aaagggatat acgtaatgtg ttgtccttga	600
	gagtgttggt aaacggaaca ttcctcaagc accctaattg atacaagtcc ttatcaactc	660
25	tgcatagatt gaatgcatat gaccagagtg ggaggcttgt tgctaaactt gttgctactg	720
	atgatcttac agtgaggat gaagaagatg gccatcggat cctcaactca ctcttcgagc	780
	gttttaatga aggacattca aagccaattc gagcagctga aactgcggtg ggagtcttat	840
30	cccaatttgg tcaagagcac cgattatcac cagaggaggg agacaattag actggttacg	900
	gaagaacttt atcttttaag taaaagaatt gatgataaca tattgttcca caaacagta	960
35	atagctaaca gctccataat agctgacatg attgtatcat tatcattatt ggaaacattg	1020
	tatgaaatga aggatgtggt tgaagtgtac agcaggcagt gcttgtgaat ttaaaataaa	1080
	aatcctcttg ttactact	1098
40		
45		
50		
55		
60		
65		