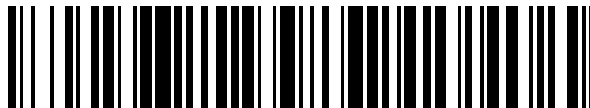


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 033**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 7/04** (2006.01)

**C07K 14/11** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005 E 05780068 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **11.04.2007 EP 1771552**

54 Título: **Variantes de hemaglutinina y neuraminidasa de influenza**

30 Prioridad:

**25.05.2004 US 574553 P**

**28.02.2005 US 657554 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.01.2013**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)**  
**One MedImmune Way**  
**Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**YANG, CHIN-FEN y**  
**KEMBLE, GEORGE**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 394 033 T3**

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

Variantes de hemaglutinina y neuraminidasa de influenza

5 **Antecedentes de la invención**

Las vacunas contra cepas diversas y evoluciones de influenza son importantes desde un punto de vista de la salud de la comunidad, así como comercialmente, ya que cada año numerosos individuos se ven infectados con diferentes cepas y tipo del virus influenza. Los bebés, los ancianos, aquellos sin un cuidado sanitario adecuado y personas inmunocomprometidas están en riesgo especial de muerte por dichas infecciones. Lo que compone el problema de las infecciones por influenza es que se generan nuevas cepas de influenza fácilmente y pueden propagarse entre diversas especies, necesitando de este modo la producción continua de nuevas vacunas.

Se han producido numerosas vacunas capaces de producir una respuesta inmune protectora específica para dichos virus/cepas virales diferentes y de influenza durante más de 50 años e incluyen vacunas de virus completo, vacunas de virus dividido, vacunas de antígeno de superficie y vacunas de virus vivo atenuado. Sin embargo, aunque las formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacuna son capaces de producir una respuesta inmune sistémica, las vacunas de virus vivo atenuado tienen la ventaja de ser capaces también de estimular la actividad de la mucosa local en el tracto respiratorio. Se ha hecho un considerable trabajo en la producción de virus de influenza, y fragmentos de los mismos, para la producción de vacunas por los presentes inventores y colaboradores; véase, por ejemplo, el documento US 2004 029 251 y el documento US 2005 042 229.

A causa del surgimiento continuo (o resurgimiento) de cepas diferentes de influenza, continuamente se desean nuevas vacunas contra influenza. Dichas vacunas típicamente se crean usando restos antigénicos de las cepas virales recién surgidas, por tanto, son altamente deseables polipéptidos y polinucleótidos de nuevas cepas virales recién surgidas, o recién resurgidas (especialmente secuencias de genes antigénicos).

Webby *et al.* 2004 describe la producción de un virus de referencia contra los virus 2004 H5N1 que circulan en Asia. El virus de referencia descrito en Webby *et al.* 2004 se basa en una estructura A/Puerto Rico/8/34 que comprende una secuencia HA derivada de A/Hong Kong/213/03 en la que los aminoácidos polibásicos que están asociados con alta virulencia se han eliminado.

Subbarao *et al.* 2003 describe un virus influenza reagrupado H5N1 basado en una estructura A/Puerto Rico/8/34 y una secuencia HA y NA de A/HK/491/97, donde el sitio de escisión multibásico en la secuencia HA se mutagenizó.

Hien *et al.* 2004 describe las características clínicas y hallazgos epidemiológicos preliminares en pacientes con casos confirmados de influenza aviar A/H5N1) en Vietnam en diciembre de 2003 y enero de 2004.

El registro epidemiológico semanal publicado por la Organización Mundial de la Salud en 2004 describe cinco casos humanos confirmados por laboratorio de influenza aviar A H5N1 todos de Hanói y obtenidas en el primer mes del año.

Wareing *et al.* 2001 compararon la inmunogenicidad de las cepas donantes adaptadas al frío ruso A/Leningrad/134/17/57 y A/Leningrad/134/47/57 y la cepa de Estados Unidos A/Ann Arbor/6/60-ca en ratones con sus respectivos virus parentales de tipo silvestre.

La presente descripción proporciona variantes de hemaglutinina y neuraminidasa de influenza nuevas y/o recién aisladas que son capaces de usarse en la producción de numerosos tipos de vacunas así como en investigación, diagnóstico, etc. Llegarán a ser evidentes otros numerosos beneficios tras la revisión de lo siguiente.

50 **Sumario de la invención**

La invención está abarcada por las reivindicaciones independientes. En este documento se describe un polipéptido aislado o recombinante que se selecciona entre: los polipéptidos codificados por una cualquiera de las secuencias de por ejemplo SEQ ID No: 1 o SEQ ID No: 2, uno cualquiera de los polipéptidos codificados por ejemplo SEQ ID No: 1 o SEQ ID No: 2 uno cualquiera de los polipéptidos de SEQ ID No: 11 o SEQ ID No: 12; solamente la fase de lectura abierta de los polipéptidos de SEQ ID No: 11 o SEQ ID No: 12; formas alternativas (por ejemplo, la forma madura sin el péptido señal, o sin las secuencias 5' y 3' fuera de la fase de lectura abierta, o las secuencias expresadas en la superficie de un virus (por ejemplo, influenza)) del polipéptido de SEQ ID No: 11-12. Los polipéptidos descritos en este documento comprende opcionalmente proteínas de fusión, proteínas con una secuencia líder, un polipéptido precursor, proteínas con una señal de secreción o una señal de localización, o proteínas con una marca epitópica, una marca E, o una marca epitópica His. Las secuencias descritas en este documento también se muestran en el Apéndice 1 y en la lista de secuencias de este documento. Las secuencias de hemaglutinina descritas en este documento comprenden secuencias con sitios de escisión polibásicos modificados (que permiten de este modo el crecimiento de los virus en huevos). Las secuencias del polipéptido hemaglutinina de SEQ ID No: 11-12 comprende las secuencias del péptido señal amino-terminal endógenas, sin embargo, las

secuencias del polipéptido hemaglutinina descritas en este documento también incluyen la forma madura (péptido señal amino-terminal escindido) de los polipéptidos hemaglutinina. Los sitios de escisión de cualquier secuencia del polipéptido hemaglutinina de cualquier cepa de influenza puede medirse o predecirse rutinariamente usando cualquiera de varios métodos en la técnica.

5 En este documento también se describe una composición con uno o más polipéptidos enumerados anteriormente, o fragmentos de los mismos. Se describen adicionalmente polipéptidos que se unen específicamente por un antisuero policlonal creado contra al menos un antígeno que comprende al menos una secuencia de aminoácido descrita anteriormente, o un fragmento de la misma. Dichos anticuerpos específicos para los polipéptidos descritos anteriormente también se describen en este documento. Los polipéptidos descritos en este documento son  
10 opcionalmente inmunogénicos.

15 Se describen adicionalmente composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de uno o más de cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente así como métodos para estimular el sistema inmune de un individuo para producir una respuesta inmune protectora contra el virus influenza administrando al individuo una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos anteriores en un vehículo fisiológicamente aceptable.

20 La invención incluye el virus influenza recombinante caracterizado por las reivindicaciones adjuntas que comprende uno o más de los polipéptidos o polinucleótidos anteriores, además de composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho virus influenza recombinante. El virus influenza recombinante de la invención para su uso en métodos para estimular el sistema inmune de un individuo para producir una respuesta inmune protectora contra el virus influenza, a través de la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho virus influenza recombinante en un vehículo fisiológicamente aceptable también  
25 son parte de la invención.

30 En este documento también se describe una composición de materia que tiene dos o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente (por ejemplo, una biblioteca que comprende al menos aproximadamente 2, 5, 10, 50 o más ácidos nucleicos). Dichas composiciones pueden producirse opcionalmente por escisión de uno o más ácidos nucleicos descritos anteriormente (por ejemplo, mecánicamente, químicamente, enzimáticamente con una endonucleasa de restricción/ARNasa/ADNasa, etc.). Otras composiciones incluyen, por ejemplo, composiciones producidas por la incubación de uno o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente en presencia de desoxirribonucleótidos trifosfato y una polimerasa termoestable de ácido nucleico.

35 En este documento también se describen células que comprenden al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente, o un fragmento escindido o amplificado o producto de los mismos. Estas pueden expresar opcionalmente un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico. Adicionalmente se describen vectores (por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, fragmentos virales, etc.) que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Dichos vectores pueden comprender opcionalmente un vector de expresión. Los  
40 vectores de expresión preferidos incluyen, aunque sin limitación, vectores que comprenden el promotor pol I y secuencias de terminación o vectores que usan los promotores tanto pol I como pol II "el sistema promotor pol II/pol III" (por ejemplo, Zobel et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21:3607; documento US20020164770; Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol. 1999, 73:9679; y documento US20030035814). También se describen células transducidas por dichos vectores.

45 En algunas realizaciones, la invención abarca un virus (por ejemplo, un virus influenza) que comprende uno o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente (por ejemplo, que codifican hemaglutinina y/o neuraminidasa) caracterizado por las reivindicaciones adjuntas. Las composiciones inmunogénicas que comprenden dicho virus también son parte de la presente invención caracterizada por las reivindicaciones adjuntas. Dichos virus son un virus reagrupado, tal como un virus reagrupado 6:2 (por ejemplo, que comprende 6 regiones codificantes de genes de uno o más virus donantes diferentes de A/Ann Arbor/6/60 y al menos una región que codifica un gen de una o más de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente que codifica hemaglutinina A que comprende la SEQ ID No: 11 o una hemaglutinina que comprende la SEQ ID No: 11 y neuraminidasa caracterizada por las reivindicaciones  
50 adjuntas. Los virus reagrupados (opcionalmente vivos) de la invención pueden incluir virus donantes que son uno o más de, por ejemplo, sensibles al frío, adaptados al frío, o atenuados. Por ejemplo, los virus reagrupados pueden comprender por ejemplo, PR8, etc. Los virus reagrupados de la invención excluyen A/Ann Arbor/6/60. Los métodos caracterizados por las reivindicaciones adjuntas para producir virus influenza recombinantes a través del cultivo de una célula hospedadora que alberga un virus influenza en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permitan la expresión de ácido nucleico y, el aislamiento del virus influenza recombinante de una o más de las células hospedadoras o el medio también son parte de la invención.  
60

65 En otras realizaciones de este documento, la invención comprende composiciones inmunogénicas que tienen una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de los virus influenza recombinantes descritos anteriormente caracterizados por las reivindicaciones adjuntas. Otras realizaciones incluyen en virus influenza recombinantes de la invención para su uso en métodos para estimular el sistema inmune de un individuo para producir una respuesta inmune protectora contra el virus influenza administrando al individuo una cantidad inmunológicamente eficaz de

cualquiera de los virus influenza recombinantes caracterizados por las reivindicaciones adjuntas (opcionalmente en un vehículo fisiológicamente eficaz).

5 En este documento también se describen métodos para producir un polipéptido aislado o recombinante cultivando cualquier célula hospedadora anterior, en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permitan la expresión de ácido nucleico y, aislando el polipéptido de una o más de las células hospedadoras o el medio en el que se cultivan las células.

10 Las composiciones inmunogénicas caracterizadas por las reivindicaciones adjuntas también son características de la invención. Por ejemplo, composiciones inmunogénicas que comprenden uno cualquiera o más de los virus descritos anteriormente caracterizados por las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, junto con uno o más componentes de administración farmacéuticamente aceptables).

15 El virus recombinante de la invención para su uso en métodos para producir respuestas inmunogénicas en un sujeto a través de la administración de una cantidad eficaz de cualquiera de los virus anteriores (o composiciones inmunogénicas) a un sujeto también está dentro de la presente invención. Adicionalmente, el virus recombinante de la invención para su uso en métodos de tratamiento profiláctico de una infección vírica (por ejemplo, influenza vírica) en un sujeto a través de la administración de uno cualquiera o más de los virus descritos anteriormente (o composiciones inmunogénicas) en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunogénica contra la infección vírica también es parte de la presente invención. Los sujetos para dicho tratamiento pueden incluir mamíferos (por ejemplo, seres humanos). Dicho virus recombinante de la invención para su uso en dichos métodos también puede ser para administración *in vivo* al sujeto así como para administración *in vitro* o *ex vivo* a una o más células del sujeto. Adicionalmente, dicho virus recombinante de la invención para su uso en dichos métodos también puede comprender una composición del virus y un excipiente farmacéuticamente aceptable para administración al sujeto en  
25 una cantidad eficaz para tratar profilácticamente la infección vírica.

30 En este documento también se describen composiciones de materia que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos hemaglutinina y/o neuraminidasa de una o más cepas pandémicas de la influenza y secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos de A/Ann Arbor/6/60. Se describen adicionalmente composiciones de materia que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos hemaglutinina y/o neuraminidasa de una o más cepas pandémicas de la influenza y secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos de PR8 o A/Ann Arbor/6/60. Dichas secuencias pueden incluir las enumeradas en la lista de secuencias de este documento. Adicionalmente, estas composiciones incluyen composiciones de materia que comprenden secuencias que codifican la hemaglutinina y/o neuraminidasa de una o  
35 más cepas pandémicas de la influenza y secuencias de ácido nucleico que codifican una cepa estructural seleccionada en una reagrupación 6:2. Dicha composición descrita en este documento incluye secuencias que codifican la hemaglutinina y neuraminidasa seleccionadas entre la lista de secuencias de este documento y una cepa estructural, donde la cepa estructural el PR8 o A/Ann Arbor/6/60. También se describen composiciones descritas anteriormente donde la hemaglutinina comprende un sitio de escisión polibásico modificado. La invención también incluye una vacuna viva atenuada contra la influenza que comprende dichas composiciones anteriores caracterizadas por las reivindicaciones adjuntas.

40 Estos y otros objetos y características de la invención llegarán a ser completamente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada junto con las figuras adjuntas y el apéndice.

#### 45 **Breve descripción de los dibujos**

50 Figura 1: Muestra modificaciones diseñadas por ingeniería en el gen HA de VN/1203/2004 para retirar el sitio de escisión polibásico.

Figura 2: Presenta los resultados que muestran que virus reagrupados H5N1 ca administrado por vía intranasal no se replican en pollos.

55 Figura 3: Ilustra que las vacunas candidatas H5N1/AA ca no son letales para ratones.

Figura 4: Ilustra que los virus reagrupados H5N1 ca 1997 y 2004 tienen restringida la replicación en ratones.

Figura 5: Ilustra que los virus influenza reagrupados H5N1/AA ca tienen restringida la replicación en pulmones de ratones.

60 Figura 6: Muestra los títulos séricos de Ab HAI producidos en ratones después de una única dosis i.n. de vacuna.

Figura 7: Muestra los títulos séricos de Ab neutralizante producidos en ratones después de una única dosis i.n. de vacuna.

Figura 8: Ilustra que virus reagrupado H5N1 *ca* protegen a los ratones de exposiciones letales con 50, 500 ó 5000 LD<sub>50</sub> de virus H5N1 de tipo silvestre.

5 Figura 9: Ilustra la eficacia de la protección contra la replicación pulmonar de virus de exposición H5N1 homólogos y heterólogos en ratones.

Figura 10: Ilustra la eficacia de protección contra la replicación de virus de exposición H5N1 homólogos y heterólogos en el tracto respiratorio superior de ratones.

10 Figura 11: Ilustra la eficacia de protección conferida por la vacuna 2004 H5N1 *ca* contra exposición de elevada dosis (10<sub>5</sub>TCID<sub>50</sub>) con virus H5N1 wt homólogos o heterólogos en ratones.

15 Figura 12: Ilustra la eficacia de protección conferida por vacunas 1997 y 2003 H5N1 *ca* contra exposiciones de alta dosis (10<sub>5</sub>TCID<sub>50</sub>) con virus H5N1 de tipo silvestre homólogos o heterólogos en ratones.

Figura 13: Ilustra la eficacia de protección conferida por la vacuna 2004 H5N1 *ca* contra dosis bajas o elevadas de exposiciones al virus H5N1 de tipo silvestre homólogo en ratones.

## 20 Descripción detallada

### Definiciones

25 Salvo que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica al que pertenece la invención. Las siguientes definiciones suplementan las de la técnica y se refieren a la presente solicitud y no deben imputarse necesariamente a ningún caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a cualquier patente o solicitud del mismo propietario que la presente. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica para ensayar la presente invención, en este documento se describen los materiales y métodos preferidos. Por consiguiente, la terminología usada en este documento es con el propósito de describir las realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante.

30 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un virus" incluye una pluralidad de virus; una referencia a una "célula hospedadora" incluye mezclas de células hospedadoras, y similares.

35 Una "secuencia de aminoácidos" es un polímero de restos aminoácidos (una proteína, polipéptido, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero de aminoácidos, dependiendo del contexto.

40 Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido", "secuencia polinucleotídica" y "secuencia de ácido nucleico" se refieren a polímeros desoxirribonucleotídicos o ribonucleotídicos monocatenarios o bicatenarios, quimeras o análogos de los mismos, o una cadena de caracteres que representa esto, dependiendo del contexto. Como se usa en este documento, el término incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos de origen natural que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales ya que hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de un modo similar a los nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos). Salvo que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular abarca opcionalmente secuencias complementarias además de la secuencia explícitamente indicada. Puede determinarse para cualquier secuencia polinucleotídica especificada, el ácido nucleico dado o la secuencia polinucleotídica complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).

45 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" también abarca cualquier cadena física de unidades monoméricas que pueda corresponderse a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero de ADN o ARN típico), PNA, oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas en un ARN o ADN biológico en solución, tal como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario o bicatenario.

50 Una "subsecuencia" es cualquier porción de una secuencia completa, hasta e incluyendo la secuencia completa. Típicamente, una subsecuencia comprende menos que la secuencia de longitud completa. Una "subsecuencia única" es una subsecuencia que no se encuentra en ninguna secuencia polinucleotídica o polipeptídica de influenza determinada previamente.

55 El término "variante" con respecto a un polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios "conservativos", donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, el reemplazo de leucina con isoleucina. Como alternativa, una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, el reemplazo de una glicina con un triptófano. Una variación minoritaria análoga también puede incluir una delección o inserción de un aminoácido, o ambos. Pueden encontrarse directrices para determinar qué restos

aminoácidos pueden sustituirse, insertarse, o delecionarse sin eliminar la actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software de DNASTAR. En este documento también se describen ejemplos de sustituciones conservativas.

5 El término "gen" se usa ampliamente para hacer referencia a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc, a un ARNm codificados por esa secuencia genómica.

10 Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen "promotores" y "potenciadores", a los que dichas proteínas reguladoras tales como factores de transcripción se unen, provocando la transcripción de secuencias adyacentes o cercanas. Un promotor o potenciador "específico de tejido" es uno que regula la transcripción en un tipo o tipos tisulares o celulares específicos.

15 "Expresión de un gen" o "expresión de un ácido nucleico" significa la transcripción de ADN en ARN (opcionalmente incluyendo la modificación del ARN, por ejemplo, corte y ajuste), traducción de ARN en un polipéptido (posiblemente incluyendo la posterior modificación del polipéptido, por ejemplo, modificación post-traducciona), o tanto transcripción como traducción, como se indique por el contexto.

20 Una "fase de lectura abierta" u "ORF" es una posible fase de lectura de traducción de ADN o ARN (por ejemplo, de un gen), que tiene capacidad de traducirse en un polipéptido. Es decir, la fase de lectura no está interrumpida por codones de parada. Sin embargo, debe apreciarse que el término ORF no indica necesariamente que el polinucleótido se traduzca de hecho en un polipéptido.

25 El término "vector" se refiere al medio por el cual un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagómidos, transposones, cromosomas artificiales, y similares, que se replican de forma autónoma y puede integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto por ADN como por ARN dentro de la misma cadena, un ADN o ARN conjugado a polilisina, un ADN o ARN conjugado a un péptido, un ADN conjugado a un liposoma, o similares, que no se replican de forma autónoma. En muchos casos habituales, pero no todos, los vectores son plásmidos.

30 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 mismo. Típicamente, el ácido nucleico a expresar está "unido de forma funcional" a un promotor y/o potenciador, y está sometido al control regulador de la transcripción por el promotor y/o potenciador.

35 Un "vector de expresión bidireccional" se caracteriza por dos promotores alternativos orientados en direcciones opuestas con relación al ácido nucleico situado entre los dos promotores, de modo que la expresión puede iniciarse en ambas orientaciones provocando, por ejemplo, la transcripción de ARN tanto de la cadena positiva (+) o con sentido, como de cadena negativa (-) o antisentido.

40 Un "polipéptido" es un polímero que comprende dos o más restos aminoácidos (por ejemplo, un péptido o una proteína). El polímero puede comprender opcionalmente modificaciones tales como glicosilación o similares. Los restos aminoácidos del polipéptido pueden ser naturales o no naturales y pueden estar no sustituidos, no modificados, sustituidos o modificados.

45 En el contexto de la invención, el término "aislado" se refiere a un material biológico, tal como un virus, un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que lo acompañan normalmente o interaccionan con el mismo en su entorno de origen natural. El material biológico aislado opcionalmente comprende material adicional no encontrado con el material biológico en su entorno natural, por ejemplo, una célula o virus de tipo silvestre. Por ejemplo, si el material está en su entorno natural, tal como una célula, el material puede haberse  
50 situado en una localización en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativo para dicho material encontrado en ese entorno. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un potenciador, etc.) llega a estar aislado si se introduce por un medio de origen no natural en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, tal como un plásmido o vector viral, o amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Dichos ácidos nucleicos también se mencionan como ácidos nucleicos "heterólogos". Un virus  
55 aislado, por ejemplo, está en un entorno (por ejemplo, un sistema de cultivo celular, o purificado del cultivo celular) diferente del entorno nativo del virus de tipo silvestre (por ejemplo, la nasofaringe de un individuo infectado).

60 El término "quimérico" o "quimera", cuando se hace referencia a un virus, indica que el virus incluye componentes genéricos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa o fuente viral parental. De forma similar, el término "quimérico" o "quimera", cuando hace referencia a una proteína viral, indica que la proteína incluye componentes polipeptídicos (es decir, subsecuencias de aminoácidos) derivados de más de una cepa o fuente viral parental.

El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o proteína) se ha alterado de forma artificial o sintética (no natural) por intervención humana. La alteración puede realizarse en el material dentro, o retirado de, su entorno o estado natural. Específicamente, por ejemplo, un virus influenza es recombinante cuando se produce por la expresión de un ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, un "ácido nucleico recombinante" es uno que se hace recombinante recombinando ácidos nucleicos, por ejemplo, durante clonación, arrastre de ADN u otros procedimientos, o por mutagénesis química u otra mutagénesis; un "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante" es un polipéptido o proteína que se produce por expresión de un ácido nucleico recombinante; y un "virus recombinante", por ejemplo, un virus influenza recombinante, se produce por la expresión de un ácido nucleico recombinante.

El término "reagrupado", cuando hace referencia a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa o fuente viral parental. Por ejemplo, un reagrupado 7:1 incluye 7 segmentos genómicos virales (o segmentos génicos) derivado de un primer virus parental, y 1 único segmento genómico viral complementario, por ejemplo, que codifica una hemaglutinina o neuraminidasa. Un reagrupado 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, más habitualmente los 6 genes internos de un primer virus parental, y 2 segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, de un virus parental diferente.

El término "introducido" cuando hace referencia a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde el ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado de forma transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación" y "transducción". En el contexto de la invención puede emplearse una diversidad de métodos para introducir ácidos nucleicos en células, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

La expresión "célula hospedadora" significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y soporta la replicación y/o expresión del ácido nucleico. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, de insecto, de anfibio, de ave o mamífero, incluyendo células humanas. Las células hospedadoras ejemplares pueden incluir, por ejemplo, células Vero (riñón de mono verde africano), células BHK (riñón de cría de hámster), células de riñón de pollo primarias (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), etc.

Una "cantidad inmunológicamente eficaz" de virus influenza es una cantidad suficiente para potenciar la propia respuesta inmune de un individuo (por ejemplo, de un ser humano) contra una exposición posterior al virus influenza. Los niveles de inmunidad inducida pueden controlarse, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos de secreción y/o séricos neutralizantes, por ejemplo, por neutralización de placas, fijación del complemento, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, o ensayo de microneutralización.

Una "respuesta inmune protectora" contra el virus influenza se refiere a una respuesta inmune mostrada por un individuo (por ejemplo, un ser humano) que es protectora contra la enfermedad cuando el individuo se expone posteriormente a y/o se infecta con dicho virus influenza. En algunos casos, el virus influenza (por ejemplo, de circulación natural) aún puede causar infección, pero no puede causar una infección grave. Típicamente, la respuesta inmune protectora provoca niveles detectables de anticuerpos séricos y de secreción engendrados por el hospedador que son capaces de neutralizar el virus de la misma cepa y/o subgrupo (y posiblemente también de un cepa y/o subgrupo no de vacuna diferente) *in vitro* e *in vivo*.

Como se usa en este documento, un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gama, delta, epsilon y mu, así como una miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gama, mu, alfa, delta, o epsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)'2, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)'2 puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo de este modo el dímero F(ab)'2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999), para una descripción más detallada de otros fragmentos de

anticuerpo). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un especialista en la técnica apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden sintetizarse de novo de forma química o utilizando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en este documento, incluye anticuerpos o fragmentos producidos por la modificación de los anticuerpos completos o sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena múltiple o sencilla, incluyendo anticuerpos Fv de cadena sencilla (sFv o scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable están unidas juntas (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo, y anticuerpos humanizados o quiméricos.

#### Virus influenza

Los péptidos y polinucleótidos descritos en este documento, por ejemplo, la SEQ ID Nos: 1-20, son variantes de las secuencias HA y NA de la influenza. En general, los virus influenza están compuestos por un núcleo ribonucleoproteico interno que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envuelta lipoproteica exterior revestida por una proteína de matriz. El genoma de los virus influenza están compuestos por ocho segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de cadena lineal (-), que codifica las proteínas inmunogénicas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y seis polipéptidos centrales internos: la nucleoproteína de nucleocápsida (NP); proteína de matriz (M); proteínas no estructurales (NS); y 3 proteínas ARN polimerasa (PA, PB1, PB2). Durante la replicación, el ARN viral genómico se transcribe en ARN mensajero de cadena (+) y ARNc genómico de cadena (-) en el núcleo de la célula hospedadora. Cada uno de los ocho segmentos genómicos se empaqueta en complejos ribonucleoproteicos que contienen, además del ARN, NP y un complejo polimerasa (PB1, PB2, y PA).

La influenza se agrupa habitualmente en las categorías de influenza A e influenza B. Los virus influenza A e influenza B contienen cada uno ocho segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa. El genoma de la influenza A codifica once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican tres polipéptidos, que componen una ARN polimerasa dependiente de ARN. El segmento 1 codifica la proteína del complejo polimerasa PB2. Las restantes proteínas polimerasa PB1 y PA están codificadas por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de la influenza codifica una pequeña proteína, PB1-F2, producida de una fase de lectura alternativa dentro de la región codificante de PB1. El segmento 4 codifica la glicoproteína de superficie hemaglutinina (HA) implicada en la adhesión celular y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica el polipéptido nucleoproteico de nucleocápsida (NP), el componente estructural principal asociado con el ARN viral. El segmento 6 codifica una glicoproteína de envuelta neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica dos proteínas de matriz, denominadas M1 y M2, que se traducen a partir de ARNm con corte y ajuste diferencial. El segmento 8 codifica NS1 y NS2, dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes de ARNm con corte y ajuste alternativo. Los ocho segmentos genómicos de la influenza B codifican 11 proteínas. Los tres genes más grandes codifican 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 fases de lectura solapantes de un ARNm bicistrónico. El segmento 7 de la influenza B también codifica dos proteínas: M1 y BM2. El segmento más pequeño codifica dos productos: NS1 se traduce a partir del ARN de longitud completa, mientras que NS2 se traduce a partir de una variante de ARNm de corte y ajuste.

#### Vacunas contra el virus influenza

Las secuencias, composiciones y métodos de este documento se refieren principalmente, pero no únicamente, a la producción de virus influenza para vacunas. Históricamente, las vacunas contra el virus influenza se han producido principalmente en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionadas o basadas en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus reagrupados que incorporan hemaglutinina y/o neuraminidasa seleccionadas, antígenos en el contexto de una cepa maestra sensible a la temperatura atenuada aprobada. Después del cultivo del virus a través de múltiples pases en huevos de gallina, los virus influenza se recuperan y, opcionalmente, se inactivan, por ejemplo, usando formaldehído y/o  $\beta$ -propiolactona (o se usa alternativamente en vacunas atenuadas vivas). Por tanto, se apreciará que las secuencias de HA y NA (por ejemplo, SEQ ID Nos: 1-20) son bastante útiles para construir vacunas contra la influenza. La presente descripción incluye virus/vacunas que comprenden secuencias de HA o HA y NA de cepas pandémicas de la influenza (incluyendo cuando las secuencias HA comprende sitios de escisión polibásicos modificados tales como las modificaciones descritas en este documento); e incluyendo cuando los virus/vacunas comprenden una estructura ca tal como la estructura de PR8.

Los intentos de producir vacunas recombinantes y reagrupados en cultivo celular se han visto impedidos por la incapacidad de algunas de las cepas aprobadas para producción de vacunas de crecer de forma eficaz en condiciones de cultivo celular convencionales. Sin embargo, trabajos previos de los inventores y sus colaboradores proporcionaron un sistema de vector, y métodos para producir virus recombinantes y reagrupados en cultivo, por tanto, haciendo posible producir rápidamente vacunas correspondientes a una o muchas cepas antigénicas seleccionadas de virus, por ejemplo, las cepas A o B, diversos subtipos de subcepas, etc., por ejemplo, que comprenden las secuencias HA y/o NA de este documento. Véase, el Sistema Multiplásmido para la producción del virus influenza, documento US 2004029251. Típicamente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como un

incubador de cultivo celular, en humedad y CO<sub>2</sub> controlados, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para asegurar que la temperatura no excede de 35°C. Los virus influenza reagrupados pueden obtenerse fácilmente introduciendo un subconjunto de vectores correspondientes a segmentos genómicos de un virus influenza maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de HA y/o NA de este documento). Típicamente, las cepas maestras se seleccionan en base a las propiedades deseables relevantes para la administración de la vacuna. Por ejemplo, para la producción de vacunas, por ejemplo, para la producción de una vacuna viva atenuada, la cepa de virus donante maestra puede seleccionarse para un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura. Se apreciará que las secuencias Ha y Na de este documento son capaces de reagruparse con varios genes virales o tipos virales (por ejemplo, varias "estructuras" diferentes tales como PR8, etc., que contienen los otros genes de la influenza presentes en un reagrupado, concretamente los genes no HA y no NA).

Diversas realizaciones de este documento pueden comprender vacunas vivas atenuadas indicadas en las reivindicaciones, que tienen las secuencias HA y/o NA de SEQ ID No: 11 o SEQ ID No: 12 de este documento, para influenza pandémica. Dichas vacunas comprenden las secuencias HA o HA y NA de SEQ ID Nos: 11-12, o sus nucleótidos correspondientes de por ejemplo SEQ ID Nos: 1-2. Un problema que surge del cultivo de cepas virales de vacuna (por ejemplo, reagrupados) en huevos es que las cepas aviarias (que pueden estar implicadas en pandemias) pueden eliminar los huevos en que las vacunas tienen que producirse y son, por tanto, difíciles de manipular, producir, etc. a través del uso de producción reagrupante tradicional (rescate no plasmídico). Dichas cepas aviarias son de interés ya que las evidencias indican que pueden producir influenza en seres humanos y posibles pandemias. Por tanto, el uso de sistemas de rescate de plásmidos para crear/manipular reagrupados de influenza con cepas pandémicas tales como diversas secuencias aviarias (por ejemplo, las secuencias HA y NA de este documento) es bastante deseable. Se apreciará, sin embargo, que las actuales secuencias también son capaces de usarse con sistemas no plasmídicos o tradicionales.

Los pájaros acuáticos (entre otros) pueden infectarse por virus de influenza A de 15 subtipos de hemaglutinina (HA) y 9 neuraminidasa (NA). Dichos pájaros pueden servir como reserva a partir de los cuales pueden introducirse nuevos subtipos de influenza en poblaciones humanas y causar pandemias. La observación de que los virus de influenza A H7N7 aviar infectaron seres humanos en Holanda en 2003 y los virus aviarios H5N1 y H9N2 infectaron seres humanos en Hong Kong y China anteriormente, crea la preocupación de que estos (y otros) subtipos tienen el potencial de causar pandemias. Por tanto, las vacunas tienen que prevenir infecciones humanas con virus de influenza A aviarios. Recientemente obtuvieron licencia en los Estados Unidos vacunas contra el virus de influenza A vivo atenuado contra virus de influenza humana. Véase anteriormente. Dichos vacunas son virus H1N1 y H3N2 reagrupados en los que los genes de las proteínas internas de A/Ann Arbor (AA)/6/60 (H2N2) virus adaptado al frío (*ca*) confieren los fenotipos de atenuación adaptado al frío y se sensible a temperatura del virus *ca* AA en los virus reagrupados (es decir, los que tienen los genes de hemaglutinina y neuraminidasa de la cepa no Ann Arbor). Se han aplicado la reagrupación genética clásica y las técnicas de genética inversa basada en plásmidos para generar virus reagrupados caracterizados en las reivindicaciones adjuntas. La generación y evaluación de estos virus reagrupados como virus semilla para vacunas son etapas importantes en preparaciones pandémicas. Se contempla que ensayos clínicos pueden establecer la seguridad, efectividad e inmunogenicidad de dichas vacunas pandémicas atenuadas vivas. También se incluyen los métodos de construcción y uso de dichos virus y vacunas. "Cepas víricas pandémicas" como se usa en este documento se define como un subtipo de virus A de cepa de la influenza que no está en circulación en la población humana, que se declara como cepa pandémica por los Centros de Control de Enfermedades o la Organización Mundial de la Salud o que se conocen generalmente como tales dentro de la comunidad científica.

Como se describe en este documento, las secuencias antigénicas (por ejemplo, las secuencias HA) así como los virus y vacunas de dichos virus comprenden sitios de escisión polibásicos modificados. Algunas cepas altamente patógenas de la influenza pandémica aviar comprenden múltiples sitios de escisión de aminoácidos básicos dentro de las secuencias de hemaglutinina. Véase, por ejemplo, Li et al., J. of Infectious Diseases, 179:1132-8, 1999. Dichos sitios de escisión, en realizaciones típicas de este documento, se modifican o alteran, por ejemplo, en sus secuencias en comparación con las secuencias de tipo silvestre a partir de las cuales se obtienen las actuales secuencias (por ejemplo, para deshabilitar la escisión o reducir la escisión allí, etc.). Dichas modificaciones/alteraciones pueden ser diferentes en diferentes cepas debido a las diversas secuencias de los sitios de escisión en las secuencias de tipo silvestre. Por ejemplo, típicamente se eliminan cuatro restos polibásicos (RRKK) en 326-329 de H5 madura en secuencias de este documento (en comparación con wt). Véase la lista de secuencias y la Figura 1. Los sitios de escisión polibásicos pueden modificarse de varios modos. Por ejemplo, el sitio de escisión polibásico puede eliminarse un aminoácido cada vez (por ejemplo, una R eliminada, dos R eliminadas, RRK eliminado, o RRKK eliminado). Adicionalmente, el resto aminoácido directamente cadena arriba del sitio de escisión también puede eliminarse o alterarse (por ejemplo, de una R a una T, etc.); además, los nucleótidos que codifican el resto aminoácido directamente después del sitio de escisión también pueden modificarse. Véase, por ejemplo, la Figura 1 para una ilustración de la modificación del sitio de escisión. Además, las secuencias polipeptídicas de hemaglutinina del virus influenza comprenden secuencias péptidos señal amino-terminales, por tanto, las secuencias polipeptídicas de hemaglutinina incluyen tanto la forma madura (péptido señal amino-terminal escindido) de los polipéptidos de hemaglutinina como la forma pre-escindida de la hemaglutinina. Los sitios de escisión de cualquier secuencia polipeptídica de hemaglutinina de cualquier cepa de la influenza puede medirse o predecirse rutinariamente usando cualquiera de varios métodos en la técnica.

Las expresiones "sensible a la temperatura", "adaptado al frío" y "atenuada" se aplican a virus (típicamente usados como vacunas o para la producción de vacunas) que abarcan opcionalmente las presentes secuencias, son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión "sensible a la temperatura" (*ts*) indica, por ejemplo, que el virus muestra una reducción de factor 100 o mayor en el título a 39°C con relación a 33°C para cepas de la influenza A, o que el virus muestra una reducción de factor 100 o mayor en el título a 37°C con relación a 33°C para cepas de la influenza B. la expresión "adaptado al frío" (*c*) indica que el virus muestra crecimiento a 25°C dentro de un factor 100 de su crecimiento a 33°C, mientras que el término "atenuado" (*att*) indica que el virus se replica en las vías respiratorias superiores de hurones pero no es detectable en sus tejidos pulmonares, y no causan enfermedad tipo influenza en el animal. Se entenderá que virus con fenotipos intermedios, es decir, virus que muestran reducciones en los títulos de menos de 100 veces a 39°C (para virus de la cepa A) o 37°C (para virus de la cepa B), o que muestran crecimiento a 25°C que es más de 100 veces su crecimiento a 33°C (por ejemplo, dentro un factor 200, factor 500, factor 1000, factor 10.000 menos), y/o muestran crecimiento reducido en los pulmones con relación al crecimiento en las vías respiratorias superiores de hurones (es decir, parcialmente atenuado) y/o enfermedad tipo influenza reducida en el animal, también son virus útiles y pueden usarse junto con las secuencias HA y NA de este documento.

De nuevo, las secuencias HA y NA descritas en este documento se utilizan en dichas vacunas reagrupadas plasmídicas (y/o en otros virus y vacunas *ts*, *cs*, *ca*, y/o *att*).

## 20 Métodos y composiciones para la administración profiláctica de vacunas

Los virus recombinantes y reagrupados de la invención (por ejemplo, aquellos que comprenden polinucleótidos de, por ejemplo, SEQ ID Nos: 1-2, polipéptidos de SEQ ID Nos: 11-12), pueden administrarse profilácticamente en una cantidad inmunológicamente eficaz y en un vehículo o excipiente apropiado para estimular una respuesta inmune específica para una o más cepas del virus influenza determinada por la secuencia HA y/o NA. Típicamente, el vehículo o excipiente es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución salina acuosa, solución salina tamponada acuosa, soluciones acuosas de dextrosa, soluciones acuosas de glicerol, etanol, o combinaciones de los mismos. La preparación de dichas soluciones que asegura la esterilidad, pH, isotonicidad, y estabilidad se realiza de acuerdo con protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un vehículo o excipiente para minimizar los efectos alérgicos y otros efectos indeseables, y para adecuar la vía particular de administración, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

Un aspecto relacionado de la invención proporciona el virus influenza recombinante de la invención para su uso en métodos para estimular el sistema inmune de un individuo para producir una respuesta inmune protectora contra el virus influenza. En los métodos, se administras una cantidad inmunológicamente eficaz de un virus influenza recombinante (por ejemplo, que comprende una molécula HA y/o NA como se describe en este documento) al individuo en un vehículo fisiológicamente aceptable.

Generalmente, los virus influenza de la invención se administran en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmune específica para una o más cepas del virus influenza (es decir, contra las cepas HA y/o NA descritas en este documento). Preferiblemente, la administración de los virus influenza provoca una respuesta inmune protectora contra dichas cepas. Las dosificaciones y métodos para provocar una respuesta inmune protectora contra una o más cepas de la influenza son conocidos para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento USPN 5.922.326; Wright et al., *Infect. Immun.* 37:397-400 (1982); Kim et al., *Pediatrics* 52:56-63 (1973); y Wright et al., *J. Pediatr.* 88:931-936 (1976). Por ejemplo, los virus influenza se proporcionan en el intervalo de aproximadamente 1-1000  $HID_{50}$  (dosis infecciosa humana), es decir, aproximadamente  $10^5$  -  $10^8$  pfu (unidades formadoras de placa) por dosis administrada. Típicamente, la dosis se ajustará dentro de este intervalo en base a, por ejemplo, la edad, estado físico, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, por inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y jeringa, o un dispositivo de inyección sin aguja. Como alternativa, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, por gotas, aerosol de partículas grandes (más de aproximadamente 10 micrómetros), o pulverización en el tracto respiratorio superior. Aunque ninguna de las vías anteriores de suministro produce una respuesta inmune sistémica protectora, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad en la mucosa en el sitio de entrada del virus influenza. Para administración intranasal, a menudo se prefieren vacunas de virus vivo atenuado, por ejemplo, un virus influenza recombinante o reagrupado adaptado al frío y/o sensible a la temperatura atenuado. Véase anteriormente. Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmune protectora con una única dosis, pueden administrarse dosificaciones adicionales, por la misma vía o una diferente, para conseguir el efecto profiláctico deseado.

Típicamente, el virus influenza recombinante atenuado de esta invención usado en una vacuna está suficientemente atenuado de modo que los síntomas de la infección, o al menos los síntomas de infección grave, no sucedan en la mayoría de los individuos inmunizados (o infectados de otro modo) con el virus influenza atenuado. En algunos casos, el virus influenza atenuado aún puede ser capaz de producir síntomas de enfermedad leve (por ejemplo, enfermedad leve del tracto respiratorio superior) y/o de diseminarse a individuos no vacunados. Sin embargo, su virulencia está suficientemente anulada de modo que no aparezcan infecciones graves del tracto respiratorio inferior en el hospedador vacunado o accidental.

Alternativamente, una respuesta inmune puede estimularse por direccionamiento *ex vivo* o *in vivo* de células dendríticas con virus influenza que comprenden las secuencias de este documento. Por ejemplo, se exponen células dendríticas proliferantes a virus en una cantidad suficiente y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la  
 5 captura de los antígenos de la influenza por las células dendríticas. Las células después se transfieren a un sujeto a vacunar por métodos de trasplante intravenoso convencionales.

Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmune protectora con una única dosis, pueden administrarse dosificaciones adicionales, por la misma vía o una diferente, para conseguir el efecto profiláctico deseado. En  
 10 neonatos y bebés, por ejemplo, pueden requerirse múltiples administraciones para provocar niveles suficientes de inmunidad. La administración puede continuar a intervalos en toda la niñez, según sea necesario para mantener niveles suficientes de protección contra infección por la influenza de tipo silvestre. Así mismo, adultos que son particularmente susceptibles a infección repetida o grave de la influenza, tales como, por ejemplo, trabajadores  
 15 sanitarios, trabajadores de cuidados de día, miembros de la familia de niños jóvenes, los ancianos, e individuos con función cardiopulmonar comprometida pueden requerir múltiples inmunizaciones para establecer y/o mantener respuestas inmunes protectoras. Los niveles de inmunidad inducida pueden controlarse, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos secretores y séricos neutralizantes, y las dosificaciones pueden ajustarse o las vacunaciones repetirse según sea necesario para provocar y mantener niveles deseados de protección.

Opcionalmente, la formulación para administración profiláctica de los virus influenza también contiene uno o más  
 20 adyuvantes para potenciar la respuesta inmune de los antígenos de la influenza. Dichas adyuvantes incluyen: adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas o de hidrocarburo, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum*, y el adyuvante sintético QS-  
 25 21.

Si se desea, la administración de la vacuna profiláctica de virus influenza puede realizarse junto con la  
 30 administración de una o más moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen diversas citoquinas, linfoquinas y quimioquinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras, y proinflamatorias, tales como las interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulador de colonias (CSF) de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que los virus influenza, o pueden administrarse  
 35 por separado.

Aunque la vacunación de un individuo con un virus influenza atenuado de una cepa particular de un subgrupo  
 particular puede inducir protección cruzada contra un virus influenza de cepas y/o subgrupos diferentes, la protección cruzada puede potenciarse, si se desea, vacunando al individuo con virus influenza atenuada de al  
 40 menos dos cepas, por ejemplo, cada una de las cuales representa un subgrupo diferente. Adicionalmente, las combinaciones de vacuna pueden incluir opcionalmente mezclas de vacunas pandémicas (por ejemplo, aquellas contra cepas pandémicas de la influenza tales como diversas cepas aviarias, véase, por ejemplo, las secuencias de este documento, u otras cepas pandémicas) y cepas no pandémicas. Las mezclas de vacuna (o vacunaciones múltiples) pueden comprender componentes de cepas de la influenza humana y/o no humana (por ejemplo, aviar y humana, etc.). Así mismo, las vacunas del virus influenza atenuadas de esta invención pueden combinarse  
 45 opcionalmente con vacunas para inducir respuestas inmunes protectoras contra otros agentes infecciosos.

#### Polinucleótidos

Es bien sabido en la técnica que los segmentos polinucleotídicos de HA y NA de virus influenza comprenden tanto  
 50 una región codificante (que codifica la ORF) como regiones no codificantes (NCR), tanto 5' y 3' de la secuencia codificante HA y NA. Un ejemplo de estas NCR se muestra en las SEQ ID Nos: 1-9 (fuera de las ORF). También se sabe que pueden prepararse cebadores para estas NCR para facilitar la amplificación de los segmentos completos HA y NA del virus influenza. (Véase, por ejemplo, Hoffmann et al. Arch Virol. 2001 Dic;146(12):2275-89). Además, se sabe que las NCR de la HA y NA de la influenza pueden aumentar la eficacia para conseguir reagrupados. Por lo  
 55 tanto, las secuencias polinucleotídicas de estas NCR se describen en este documento. Cuando se amplifican los segmentos HA y NA de cualquier cepa pandémica, se podrían preparar y usar cebadores polinucleotídicos para unirse a regiones conservadas (por ejemplo, entre cepas relacionadas) de las NCR de HA y NA para la amplificación (por ejemplo, por RT-PCR).

Los polinucleótidos HA y NA del virus de la invención, por ejemplo, la SEQ ID No: 1 y la SEQ ID No: 2, se usan  
 60 opcionalmente en varias competencias diferentes alternativas a, o además de, las vacunas descritas anteriormente. Otros usos ejemplares se describen en este documento por motivos ilustrativos y no como limitaciones del intervalo real de usos. También se describen en este documento diferentes métodos de construcción, purificación, y caracterización de las secuencias de nucleótidos de la descripción. En este documento se describe que, los ácidos nucleicos incluyendo una o más secuencias polinucleotídicas descritas anteriormente se usan de forma favorable  
 65 como sondas para la detección de ácidos nucleicos correspondientes o relacionados en una diversidad de

contextos, tal como en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para encontrar y/o caracterizar variantes de la influenza homólogos (por ejemplo, homólogos a las secuencias de este documento, etc.) infectando a otras especies o en diferentes brotes de la influenza, etc. Las sondas pueden ser moléculas de ADN o ARN, tales como fragmentos de restricción de ADN genómico o clonado, ADNc, productos de amplificación por PCR, transcritos, y oligonucleótidos, y pueden variar en longitud de oligonucleótidos tan cortos como de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud a secuencias de longitud completa o ADNc en exceso de una kb o más. Por ejemplo, una sonda incluye una secuencia polinucleotídica o subsecuencia seleccionada, por ejemplo, de entre las SEQ ID No: 1 o la SEQ ID No: 2, o secuencias complementarias a las mismas. Como alternativa, se usan secuencias polinucleotídicas que son variantes de una de las secuencias designadas anteriormente como sondas. Más típicamente, dichas variantes incluyen una o unas pocas variaciones nucleotídicas conservativas. Por ejemplo, pueden seleccionarse pares (o series) de oligonucleótidos, en los que las dos (o más) secuencias polinucleotídicas son variaciones conservativas entre sí, donde una secuencia polinucleotídica corresponde de forma idéntica a una primera variante y la otra u otras corresponden de forma idéntica a variantes adicionales. Dichos pares de sondas oligonucleotídicas son particularmente útiles, por ejemplo, para experimentos de hibridación específica para detectar nucleótidos polimórficos o para, por ejemplo, detectar variantes homólogas de HA y NA de la influenza, por ejemplo, homólogos a las presentes secuencias HA y NA, que infectan otras especies o están presentes en diferentes (por ejemplo, diferentes temporal y/o geográficamente) brotes de la influenza. En otras aplicaciones, se seleccionan sondas que son más divergentes, es decir sondas que son al menos aproximadamente un 91% (o aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 98,5%, aproximadamente un 98,7%, aproximadamente un 99%, aproximadamente un 99,1%, aproximadamente un 99,2%, aproximadamente un 99,3%, aproximadamente un 99,4%, aproximadamente un 99,5%, o aproximadamente un 99,6% o más aproximadamente un 99,7%, aproximadamente un 99,8%, aproximadamente un 99,9% o más) idénticas.

Las sondas descritas en este documento, por ejemplo, ejemplificadas por secuencias derivadas de las secuencias de este documento, también pueden usarse para identificar secuencias polinucleotídicas útiles adicionales de acuerdo con procedimientos rutinarios en la técnica. Se utilizan una o más sondas, como se describe anteriormente, para explorar bibliotecas de productos de expresión o segmentos cromosómicos (por ejemplo, bibliotecas de expresión o bibliotecas genómicas) para identificar clones que incluyen secuencias idénticas a, o con similitud significativa de secuencia a, por ejemplo, una o más sondas de las secuencias de este documento, es decir, variantes, homólogos, etc. Se entenderá que además de dichos métodos físicos como exploración de bibliotecas, enfoques bioinformáticos asistidos por ordenador, por ejemplo, BLAST y otros algoritmos de búsqueda de homología de secuencia, y similares, también pueden usarse para identificar secuencias polinucleotídicas relacionadas.

Las sondas oligonucleotídicas se producen opcionalmente mediante una diversidad de métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Más típicamente, se producen por métodos sintéticos bien conocidos, tales como el método de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981) *Tetrahedron Letts* 22(20):1859-1862, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, o como se describe en Needham-Van Devanter et al. (1984) *Nucl Acids Res*, 12:6159-6168. Los oligonucleótidos también pueden prepararse de forma personalizada y encargarse de una diversidad de fuentes comerciales conocidas para los especialistas en la técnica. La purificación de oligonucleótidos, cuando es necesaria, se realiza típicamente por electroforesis en gel de acrilamida nativo o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Regnier (1983) *J Chrom* 255:137-149. La secuencia de los oligonucleótidos sintéticos puede verificarse usando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman and Moldave (eds.) Academic Press; Nueva York, *Methods in Enzymology* 65:499-560. También pueden encargarse fácilmente oligos personalizados de una diversidad de fuentes comerciales conocidas para los especialistas en la técnica.

En otras circunstancias, por ejemplo, con relación a los atributos de células u organismos que expresan los polinucleótidos y polipéptidos descritos en este documento (por ejemplo, aquellos que albergan virus que comprenden las secuencias descritas en este documento), se utilizan favorablemente sondas que son polipéptidos, péptidos o anticuerpos. Por ejemplo, se usan favorablemente polipéptidos aislados o recombinantes, fragmentos polipeptídicos y péptidos derivados de cualquiera de las secuencias aminoácidas descritas en este documento (por ejemplo, SEQ ID Nos: 11-12) y/o codificadas por secuencias polinucleotídicas descritas en este documento, por ejemplo, seleccionadas entre la SEQ ID No: 1 o la SEQ ID No: 2, para identificar y aislar anticuerpos, por ejemplo, de bibliotecas de presentación de fagos, bibliotecas combinatorias, sueros policlonales, y similares. Los fragmentos polipeptídicos incluyen un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos aminoácidos contiguos, o al menos 10 restos aminoácidos contiguos; o al menos 15 restos aminoácidos contiguos, o al menos 20 restos aminoácidos contiguos, o al menos 25 restos aminoácidos contiguos, o al menos 40 restos aminoácidos contiguos, o al menos 50 restos aminoácidos contiguos, o al menos 60 restos aminoácidos contiguos, o al menos 70 restos aminoácidos contiguos, o al menos 80 restos aminoácidos contiguos, o al menos 90 restos aminoácidos contiguos, o al menos 100 restos aminoácidos contiguos, o al menos 125 restos aminoácidos contiguos, o al menos 150 restos aminoácidos contiguos, o al menos 175 restos aminoácidos contiguos, o al menos 200 restos aminoácidos contiguos, o al menos 250 restos aminoácidos contiguos, o al menos 350 contiguos, o al menos 400 contiguos, o al menos 450 contiguos, o al menos 500 contiguos, o al menos 550 restos aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del polipéptido HA o NA descrito en este documento (por ejemplo, las SEQ ID Nos: 11-12). Los polinucleótidos que codifican dichos

fragmentos polipeptídicos, y anticuerpos que se unen específicamente a dichos polipéptidos también se describen en este documento.

Los anticuerpos específicos para cualquier secuencia o subsecuencia polipeptídica, por ejemplo, de SEQ ID No: 11 o SEQ ID No: 12, y/o codificada por las secuencias polinucleotídicas de por ejemplo la SEQ ID No: 1 o la SEQ ID No: 2, son así mismo valiosos como sondas para evaluar productos de expresión, por ejemplo, de células o tejidos. Además, los anticuerpos son particularmente adecuados para evaluar la expresión de proteínas que comprenden subsecuencias de aminoácidos, por ejemplo, de las dadas en este documento, o codificadas por secuencias polinucleotídicas mostradas en este documento, *in situ*, en una serie tisular, en una célula, tejido u organismo, por ejemplo, un organismo infectado por un virus influenza no identificado o similares. Los anticuerpos pueden marcarse directamente con un reactivo detectable, o detectarse directamente por marcaje de un anticuerpo secundario específico para la región constante de cadena pesada (es decir, isotipo) del anticuerpo específico. Detalles adicionales respecto a la producción de anticuerpos específicos se proporcionan a continuación.

#### 15 Ensayos de diagnóstico

Las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento pueden usarse en ensayos de diagnóstico para detectar la influenza (y/o hemaglutinina y/o neuraminidasa) en una muestra, para detectar secuencias tipo hemaglutinina y/o secuencias tipo neuraminidasa, y para detectar diferencias de cepas en aislados clínicos de la influenza usando fragmentos polinucleotídicos sintetizados químicamente o recombinantes, por ejemplo, seleccionados entre las secuencias de este documento. Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de las secuencias de hemaglutinina y/o neuraminidasa que comprendan al menos entre 10 y 20 nucleótidos como cebadores para amplificar ácidos nucleicos usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidos en la técnica (por ejemplo, PCR de transcripción inversa) y como sondas en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos para detectar material genético diana tal como ARN de la influenza en muestras clínicas.

Las sondas descritas en este documento, por ejemplo, como se ejemplifica por secuencias únicas seleccionadas entre las dadas en este documento, también pueden usarse para identificar secuencias polinucleotídicas útiles adicionales (tal como para caracterizar cepas adicionales de la influenza) de acuerdo con procedimientos rutinarios en la técnica. Se utilizan una o más sondas, como se ha descrito anteriormente, para explorar bibliotecas de productos de expresión o ácidos nucleicos virales clonados (es decir, bibliotecas de expresión o bibliotecas genómicas) para identificar clones que incluyen secuencias idénticas a, o con identidad de secuencia significativa con la secuencias de este documento. A su vez, cada una de estas secuencias identificadas puede usarse para preparar sondas, incluyendo pares o series de sondas variantes como se ha descrito anteriormente. Se entenderá que además de dichos métodos físicos como exploración de bibliotecas, enfoques bioinformáticos asistidos por ordenador, por ejemplo, BLAST y otros algoritmos de búsqueda de homología de secuencia, y similares, también pueden usarse para identificar secuencias polinucleotídicas relacionadas.

Las sondas descritas en este documento son particularmente útiles para detectar la presencia y para determinar la identidad de ácidos nucleicos de la influenza en células, tejidos u otras muestras biológicas (por ejemplo, un lavado nasal o lavado bronquial). Por ejemplo, las sondas descritas en este documento se utilizan favorablemente para determinar si una muestra biológica, tal como un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) o sistema modelo (tal como una muestra celular cultivada) se ha expuesto a, o se ha llegado a infectar con la influenza, o una cepa o cepas particulares de la influenza. La detección de hibridación de la sonda selecciona con ácidos nucleicos originados en (por ejemplo, aislados de) la muestra biológica o sistema modelo es indicativa de exposición a o infección con el virus (o un virus relacionado) del cual se selecciona el polinucleótido sonda.

Se apreciará que el diseño de la sonda está influenciado por la aplicación pretendida. Por ejemplo, cuando tienen que detectarse varias interacciones sonda específica alelo-diana en un único ensayo, por ejemplo, en un único chip de ADN, es deseable tener temperaturas de fusión similares para todas las sondas. Por consiguiente, las longitudes de las sondas se ajustan de modo que las temperaturas de fusión para todas las sondas en la serie sean muy similares (se apreciará que puede necesitarse diferentes longitudes para diferentes sondas para conseguir una  $T_m$  particular cuando diferentes sondas tengan diferentes contenidos de GC). Aunque la temperatura de fusión es una consideración principal en el diseño de la sonda, se usan opcionalmente otros factores para ajustar adicionalmente la construcción de la sonda, tal como selección frente a autocomplementariedad de cebador y similares.

#### Vectores. Promotores y sistemas de expresión

En este documento también se describen construcciones recombinantes que incorporan una o más de las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento. Dichas construcciones incluyen opcionalmente un vector, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), etc., en la que se ha insertado una o más de las secuencias polinucleotídicas, por ejemplo, de la SEQ ID No: 1 o la SEQ ID No: 2, o una subsecuencia de las mismas, etc., en una orientación directa o inversa. Por ejemplo, el ácido nucleico insertado puede incluir una secuencia cromosómica viral o ADNc que incluye todo o parte de al menos una de las secuencias polinucleotídicas descritas en este documento. En un ejemplo, la construcción comprende adicionalmente secuencias reguladoras, incluyen, por

ejemplo, un promotor, unido de forma funcional a la secuencia. Se conocen grandes cantidades de vectores y promotores adecuados por los especialistas en la técnica, y están disponibles en el mercado.

Los polinucleótidos pueden incluirse en uno cualquiera de una diversidad de vectores adecuados para generar ARN con sentido o antisentido, y opcionalmente, productos de expresión de polipéptidos (o péptidos) (por ejemplo, una molécula de hemaglutinina y/o neuraminidasa descrita en este documento). Dichos vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo, derivadas de SV40; plásmidos bacterianos; ADN fágico; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágico, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorrabia, adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus y muchos otros (por ejemplo, pCDL). Puede usarse cualquier vector que sea capaz de introducir material genético en una célula, y, si se desea la replicación, que sea replicable en el hospedador relevante.

En un vector de expresión, la secuencia polinucleotídica de HA y/o NA de interés se dispone físicamente en proximidad y orientación a una secuencia de control de la transcripción apropiada (por ejemplo, promotor, y opcionalmente, uno o más potenciadores) para dirigir la síntesis de ARNm. Es decir, la secuencia polinucleotídica de interés se une de forma funcional a una secuencia de control de la transcripción apropiada. Ejemplos de dichos promotores incluyen: el promotor LTR o SV40, el promotor lac o trp de *E. coli*, el promotor P<sub>L</sub> del fago lambda, y otros promotores conocidos para controlar la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus.

Es adecuada una diversidad de promotores para su uso en vectores de expresión para regular la transcripción de segmentos genómicos del virus influenza. En ciertas realizaciones, se utiliza el promotor de la ARN polimerasa II (Pol II) dependiente de ADN de citomegalovirus (CMV). Si se desea, por ejemplo, para regular la expresión condicional, pueden sustituirse otros promotores que inducen la transcripción de ARN en las condiciones especificadas, o en los tejidos o células especificados. Están disponibles numerosos promotores virales y de mamífero, por ejemplo, de seres humanos, o pueden aislarse de acuerdo con la aplicación específica contemplada. Por ejemplo, promotores alternativos obtenidos de los genomas de virus animales y humanos incluyen promotores tales como el promotor de adenovirus (tal como adenovirus 2), el virus del papiloma, virus de la hepatitis B, polioma virus, y el virus de simio 40 (SV40), y diversos promotores retrovirales. Los promotores de mamífero incluyen, entre muchos otros, el promotor de la actina, promotores de inmunoglobulina, promotores de choque térmico, y similares.

La transcripción se aumenta opcionalmente incluyendo una secuencia potenciadora. Los potenciadores son típicamente elementos de ADN cortos, por ejemplo, de 10-500 pb, de acción en cis que actúan en concierto con un promotor para aumentar la transcripción. Se han aislado muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (hemoglobina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina), y virus de células eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante heteróloga, pero típicamente se inserta en un sitio 5' al promotor. Típicamente, el promotor, y si se desea, las secuencias potenciadoras de la transcripción adicional se eligen para optimizar la expresión en un tipo de célula hospedadora en la que tiene que introducirse el ADN heterólogo (Scharf et al (1994) Heat stress promoters and transcription factors Results Probl Cell Differ 20:125-62; Kriegler et al. (1990) Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes Methods in Enzymol 185: 512-27). Opcionalmente, el amplicón también puede contener un sitio de unión al ribosoma o un sitio de entrada interno del ribosoma (IRES) para el inicio de la traducción.

Los vectores descritos en este documento también incluyen favorablemente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm, tal como un sitio de poliadenilación o una secuencia terminadora. Dichas secuencias están habitualmente disponibles desde regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Las secuencias de la señal de poliadenilación de SV40 pueden proporcionar un sitio de poliadenilación bidireccional que aísla la transcripción de moléculas de ARNm de cadena (+) desde el promotor PolII que inicia la replicación del genoma viral de cadena (-).

Además, como se ha descrito anteriormente, los vectores de expresión incluyen opcionalmente uno o más genes marcadores de selección para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas, además de los genes previamente enumerados, marcadores tales como la dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina son adecuados para la selección en cultivo celular eucariota.

El vector que contiene la secuencia de ácido nucleico apropiada como se ha descrito anteriormente, así como un promotor o secuencia de control apropiada, pueden emplearse para transformar una célula hospedadora que permita la expresión de la proteína. Aunque los vectores descritos en este documento pueden replicarse en células bacterianas, más frecuentemente será deseable introducirlos en células de mamífero, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 239, células COS, o similares, para propósitos de expresión.

Como se describe en alguna otra parte, las secuencias HA y NA de este documento pueden estar comprendidas dentro de plásmidos implicados en reagrupación de rescate de plásmidos. Véase, por ejemplo, el documento US 2004 029251 y el documento US 2005 042229. Por ejemplo, vectores de expresión preferidos descritos en este documento incluyen, aunque sin limitación, vectores que comprenden el promotor de pol I y las secuencias terminadoras o vectores que usan los promotores tanto pol I como pol II "el sistema promotor polI/polIII" (por ejemplo, Zobel et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21:3607; documento US20020164770; Neumann et al., Proc. Natal.

Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol. 1999, 73:9679; y el documento US20030035814). Los reagrupados producidos pueden incluir los genes HA y NA dispuestos con los otros 6 genes de la influenza de la cepa donante A/Ann Arbor/6/60 (y/o derivados y modificaciones de la misma), la estructura de cepa donante PR8, la estructura de cepa donante A/Leningrad/17, etc. Otras cepas estructurales se describen, por ejemplo, en el documento US20040137013 y el documento US20030147916.

#### Elementos adicionales de expresión

Más habitualmente, el segmento genómico que codifica la proteína HA y/o NA del virus influenza incluye cualquier secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo la traducción en una proteína viral funcional. En otras situaciones, puede emplearse un minigén, u otra construcción artificial que codifique las proteínas virales, por ejemplo, una proteína HA y/o NA. De nuevo, en dicho caso, a menudo es deseable incluir señales de inicio específicas que ayuden en la traducción eficaz de la secuencia codificante heteróloga. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Para asegurar la traducción del inserto completo, el codón de inicio se inserta en la fase de lectura correcta relativa a la proteína viral. Los elementos transcripciones exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso.

Si se desea, pueden incorporarse secuencias polinucleotídicas que codifican elementos expresados adicionales, tales como secuencias señal, secuencias de secreción o localización, y similares en el vector, habitualmente, en fase con la secuencia polinucleotídica de interés, por ejemplo, para dirigir la expresión del polipéptido a un compartimento, membrana, u orgánulo celular deseado, o para dirigir la secreción de los polipéptidos al espacio periplásmico o en el medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas para los especialistas en la técnica, e incluyen péptidos líder de secreción, secuencias de dirección a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención del RE, secuencias de tránsito mitocondrial), secuencias de localización/anclaje a membrana (por ejemplo, secuencias de transferencia de detención, secuencias de anclaje a GPI), y similares.

Cuando se desea la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento, señales de inicio específicas de traducción adicionales pueden mejorar la eficacia de traducción. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, un codón de inicio ATG y secuencias adyacentes, una región IRES, etc. En algunos casos, por ejemplo, se insertan moléculas de ADNc de longitud completa o segmentos cromosómicos que incluyen una secuencia codifican que incorpora, por ejemplo, una secuencia polinucleotídica descrita en este documento, un codón de inicio de la traducción y elementos de secuencia asociados en el vector de expresión apropiado simultáneamente con la secuencia polinucleotídica de interés. En dichos casos, frecuentemente no se requieren señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en que se inserta solamente una secuencia codificante de polipéptido, o una parte de la misma, a menudo se proporcionan señales de control de la traducción exógenas incluyendo, por ejemplo, un codón de inicio ATG para la expresión de la secuencia relevante. El codón de inicio se pone en la correcta fase de lectura para asegurar la transcripción de la secuencia polinucleotídica de interés. Los elementos transcripcionales exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf D. et al. (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bittner et al. (1987) Methods in Enzymol 153:516-544).

#### Producción de virus recombinante

Pueden diseñarse por ingeniería genética virus ARN de cadena negativa y recuperarse usando un enfoque de genética inversa recombinante (véase, por ejemplo, USPN 5.166.057 de Palese et al.). Dicho método se aplicó originalmente para diseñar genomas virales de la influenza (Luytjes et al. (1989) Cell 59:1107-1113; Enami et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567), y se ha aplicado satisfactoriamente a una amplia diversidad de virus ARN de cadena negativa segmentados y no segmentados, por ejemplo, el virus de la rabia (Schnell et al. (1994) EMBO J. 13: 4195-4203); VSV (Lawson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481); virus del sarampión (Radecke et al. (1995) EMBO J. 14:5773-5784); el virus de la peste bovina (Baron y Barrett (1997) J. Virol. 71: 1265-1271); virus de la parainfluenza humana (Hoffman y Banerjee (1997) J. Virol. 71: 3272-3277; Dubin et al. (1997) Virology 235:323-332); SV5 (He et al. (1997) Virology 237:249-260); virus del moquillo canino (Gassen et al. (2000) J. Virol. 74:10737-44); y virus Sendai (Park et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5537-5541; Kato et al. (1996) Genes to Cells 1:569-579). Los especialistas en la técnica estarán familiarizados con éstas y técnicas similares para producir un virus influenza que comprenda las secuencias HA y NA descritas en este documento. Los virus influenza recombinantes producidos de acuerdo con dichos métodos son una característica de la descripción así como virus influenza recombinantes que comprenden uno o más ácidos nucleicos y/o polipéptidos descritos en este documento.

#### Cultivo celular y hospedadores de expresión

En este documento también se describen células hospedadoras que se introducen (transducen, transforman o transfectan) con vectores descritos en este documento, y la producción de polipéptidos descritos en este documento por técnicas recombinantes. Las células hospedadoras están modificadas por ingeniería genética (es decir,

transducidas, transformadas o transfectadas) con un vector, tal como un vector de expresión. Como se ha descrito anteriormente, el vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Ejemplos de hospedadores de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; o células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*.

Más habitualmente, se usan células de mamífero para cultivar las moléculas HA y NA descritas en este documento. Las células hospedadoras adecuadas para la replicación de virus influenza incluyen, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7 o similares. Habitualmente, se emplean co-cultivos que incluyen dos de las anteriores líneas celulares, por ejemplo, células MDCK y células 293T o COS a una proporción, por ejemplo, de 1:1, para mejorar la eficacia de replicación. Típicamente, las células se cultivan en un medio de cultivo comercial convencional, tal como medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero (por ejemplo, suero bovino fetal al 10%), o en medio sin suero, en humedad y concentración de CO<sub>2</sub> 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, estreptomina, etc., y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, suplementos adicionales para promover las características de crecimiento favorables, por ejemplo, tripsina, β-mercaptopetanol, y similares.

Las células hospedadoras modificadas por ingeniería pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar las secuencias polinucleótidas insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son típicamente las usadas previamente con la célula hospedadora particular seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los especialistas en la técnica y en las referencias citadas en este documento, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3ª edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en ese documento. Otras referencias de ayuda incluyen, por ejemplo, Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edimburgo; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam. Detalles adicionales respecto a procedimientos de cultivo tisular de particular interés en la producción de virus influenza *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*. En Cohen and Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Además, se determinan fácilmente variaciones en dichos procedimientos adaptadas a la presente descripción a través de experimentación rutinaria y serán conocidas para los especialistas en la técnica.

Las células para la producción de virus influenza (por ejemplo, que tiene las secuencias HA y/o NA de la descripción) pueden cultivarse en medio que contiene suero o libre de suero. En algunos casos, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, típicamente es deseable cultivar las células hospedadoras en condiciones libres de suero. Las células pueden cultivarse a pequeña escala, por ejemplo, menos de 25 ml de medio, tubos o matraces de cultivo o en matraces grandes con agitación; en frascos rotatorios, o en microperlas de vehículo (por ejemplo, microperlas de vehículo DEAE-Dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer y Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-trimetilamina, tales como Hillel, SoloHill, Ann Arbor) en matraces, frascos o cultivos en reactor. Las microperlas de vehículo son esferas pequeñas (en el intervalo de 100-200 micrómetros de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para el crecimiento celular adherente por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un único litro de medio puede incluir más de 20 millones de microperlas de vehículo que proporcionan más de 8000 centímetros cuadrados de superficie de cultivo. Para producción comercial de virus, por ejemplo, para la producción de vacunas, a menudo es deseable cultivar las células en un biorreactor o fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes de por debajo de 1 litro hasta en exceso de 100 litros, por ejemplo, biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, NJ); biorreactores de laboratorio y de escala comercial de B. Braun Biotech international (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, en muchos aspectos deseados de la presente descripción, es importante que los cultivos se mantengan a una temperatura apropiada, para asegurar la recuperación eficaz de virus influenza recombinante y/o reagrupado usando sistemas multi plásmido dependientes de temperatura (véase, por ejemplo, Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus, documento US 2004 029251), calentamiento de las soluciones de virus para filtración, etc. Típicamente, se emplea un regulador, por ejemplo, un termostato, u otro dispositivo para detectar y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular y/u otra solución, para asegurar que la temperatura está al nivel correcto durante el periodo apropiado (por ejemplo, replicación del virus, etc.).

En la descripción de este documento (por ejemplo, cuando tienen que producirse virus reagrupados a partir de segmentos en vectores) se introducen vectores que comprenden segmentos del genoma de la influenza (por ejemplo, se transfectan) en células hospedadoras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas incluyendo, por ejemplo, co-precipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, y transfección empleando reactivos de transfección con poliamina. Por ejemplo, pueden introducirse por transfección vectores, por ejemplo, plásmidos, en células

hospedadoras, tales como células COS, células 293T o combinaciones de células COS o 293T y células MDCK, usando el reactivo de transfección con poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para producir virus reagrupados, etc. Por tanto, en un ejemplo, se introduce aproximadamente 1 µg de cada vector en una población de células hospedadoras con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferiblemente medio libre de suero, en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos seguido de la adición de 800 µl de medio. La mezcla de transfección se añade a las células hospedadoras, y las células se cultivan como se ha descrito mediante otros métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por consiguiente, para la producción de virus recombinantes o reagrupados en cultivo celular, se mezclan vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos genómicos (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se introducen por transfección en células hospedadoras. Opcionalmente, se reemplaza el medio que contiene suero antes de la transfección con medio libre de suero, por ejemplo, Opti-MEM I, y se incuba durante 4-6 horas.

Como alternativa, puede emplearse electroporación para introducir dichos vectores que incorporan segmentos genómicos de la influenza en células hospedadoras. Por ejemplo, se introducen favorablemente vectores plasmídicos que incorporan un virus influenza A o influenza B en células Vero usando electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. En resumen, se resuspenden aproximadamente  $5 \times 10^6$  células Vero, por ejemplo, cultivadas en medio de Eagle modificado (MEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% 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 µl a las células en la cubeta, que después se mezcla suavemente por golpeteo. La electroporación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, BioRad Gene Pulser II con Capacitance Extender Plus conectado) a 300 voltios, 950 microFaraday con una constante de tiempo entre 28-33 msegundos. Estas células se vuelven a mezclar por golpeteo suave y aproximadamente 1-2 minutos después de la electroporación se añaden 0,7 ml MEM con FBS al 10% directamente a la cubeta. Las células después se transfieren a dos pocillos de una placa de cultivo tisular convencional de 6 pocillos que contiene 2 ml de MEM, FBS al 10%. La cubeta se lava para recuperar cualquier célula restante y la suspensión de lavado se divide entre los dos pocillos. El volumen final es aproximadamente 3,5 ml. Las células después se incuban en condiciones permisivas para el crecimiento viral, por ejemplo, a aproximadamente 33°C para cepas adaptadas al frío.

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión, tales como sistemas basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, se liga opcionalmente una secuencia codificante en un complejo de transcripción/traducción adenoviral que consta del promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral producirá un virus viable capaz de expresar los polipéptidos de interés en células hospedadoras infectadas (Logan y Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci 81:3655-3659). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

Una cepa celular hospedadora se elige opcionalmente por su capacidad de modular la expresión de las secuencias insertadas o de procesar la proteína expresada del modo deseado. Dichas modificaciones de la proteína incluyen, aunque sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traducciona, que escinde una forma precursora en una forma madura, de la proteína, a veces es importante para la correcta inserción, plegamiento y/o función. Además, también es importante la apropiada localización dentro de una célula hospedadora (por ejemplo, sobre la superficie celular). Diferentes células hospedadoras tales como COS, CHO, BHK, MDCK, 293, 293T, COS7, etc. tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y pueden elegirse para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la presente proteína foránea introducida.

Para producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes codificadas por, o que tienen subsecuencias codificadas por, los polinucleótidos descritos en este documento, se usan opcionalmente sistemas de expresión estables. Por ejemplo, se transfectan líneas celulares, que expresan de forma estable un polipéptido descrito en este documento, usando vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador de selección. Por ejemplo, después de la introducción del vector, se deja que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a medio selectivo. El propósito del marcador de selección es conferir resistencia para la selección, y su presencia permite el cultivo y recuperación de células que expresan de forma satisfactoria las secuencias introducidas. Por tanto, los grupos resistentes de células transformadas de forma estable, por ejemplo, derivadas de un único tipo celular, pueden proliferarse usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular.

Las células hospedadoras transformadas con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido descrito en este documento, se cultivan opcionalmente en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. Las células que expresan dicha proteína pueden clasificarse, aislarse y/o purificarse. La proteína o fragmento de la misma producida por una célula recombinante puede estar secretada, unida a membrana, o retenida de forma intracelular, dependiendo de la secuencia (por ejemplo, dependiendo de proteínas de fusión que codifican una señal de retención en membrana o similares) y/o el vector usado.

También pueden producirse productos de expresión correspondientes a los ácidos nucleicos descritos en este documento en células no animales tales como plantas, levaduras, hongos, bacterias y similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, todos infra, pueden encontrarse detalles respecto al cultivo celular en Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamburg y Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell. Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el producto expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo para la producción de anticuerpos, se usan favorablemente vectores que dirigen una expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, aunque sin limitación, vectores de clonación y expresión multifuncionales de *E. coli* tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia codificante de interés, por ejemplo, secuencias que comprenden las encontradas en este documento, etc., pueden ligarse en el vector en fase con secuencias para la metionina de inicio de la traducción amino-terminal y los posteriores 7 restos de beta-galactosidasa que codifican una proteína de fusión beta galactosidasa catalíticamente activa; vectores pIN (Van Heeke y Schuster (1989) *J Biol Chem* 264:5503-5509); vectores pET (Novagen, Madison WI); y similares. Asimismo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH para la producción de los productos de expresión deseados. Para revisiones, véase Ausubel, infra, y Grant et al., (1987); *Methods in Enzymology* 153:516-544.

#### Hibridación de ácidos nucleicos

Puede usarse hibridación comparativa para identificar ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID Nos: 1-2), incluyendo variaciones conservativas de ácidos nucleicos descritos en este documento. Este método de hibridación comparativa es un método preferido para distinguir ácidos nucleicos. Además, los ácidos nucleicos diana que hibridan con los ácidos nucleicos representados por los mostrados en este documento en condiciones de rigurosidad elevada, ultra-elevada y ultra-ultra-elevada son características de la descripción. Ejemplos de dichos ácidos nucleicos incluyen aquellos con una o unas pocas sustituciones silenciosas o conservativas de ácido nucleico en comparación con una secuencia de ácido nucleico dada.

Se dice que un ácido nucleico diana de ensayo hibrida específicamente con un ácido nucleico sonda cuando hibrida al menos la mitad de bien con la sonda que con la diana complementaria perfectamente apareada, es decir, con una proporción señal a ruido de al menos la mitad de elevada que la hibridación de la sonda y la diana en condiciones en que una sonda perfectamente apareada se une a una diana complementaria perfectamente apareada con una proporción señal a ruido que es al menos aproximadamente 5x-10x de elevada que la observada para la hibridación con cualquiera de los ácidos nucleicos diana no apareados.

Los ácidos nucleicos "hibridan" cuando se asocian, típicamente en solución. Los ácidos nucleicos hibridan debido a una diversidad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como enlaces de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilamiento de bases y similares. Numerosos protocolos para la hibridación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Se encuentra una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* part I capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" (Elsevier, Nueva York), así como en Ausubel, Sambrook, y Berger y Kimmel, todos a continuación. Hames y Higgins (1995) *Gene Probes 1* IRL Press en Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, (Hames y Higgins 1) y Hames y Higgins (1995) *Gene Probes 2* IRL Press en Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 2) proporcionan detalles sobre la síntesis, marcaje, detección y cuantificación de ADN y ARN, incluyendo oligonucleótidos.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es formalina al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, realizándose la hibridación durante una noche. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas comprende un lavado con SSC 0,2x a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, infra para una descripción del tampón SSC y otros parámetros de hibridación de ácidos nucleicos). A menudo el lavado de alta rigurosidad está precedido por un lavado de baja rigurosidad para retirar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad es SSC 2x a 40°C durante 15 minutos. En general, una proporción señal a ruido de 5x (o mayor) a la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica.

Después de la hibridación, pueden retirarse los ácidos nucleicos no hibridados por una serie de lavados, cuya rigurosidad puede ajustarse dependiendo de los resultados deseados. Las condiciones de lavado de baja rigurosidad (por ejemplo, usando salinidad mayor y temperatura inferior) aumentan la sensibilidad, pero pueden producir señales de hibridación no específicas y altas señales de fondo. Condiciones de mayor rigurosidad (por ejemplo, usando menor salinidad y mayor temperatura que está más cerca de la  $T_m$ ) disminuyen la señal de fondo, típicamente dejando principalmente la señal específica. Véase, también, Rapley, R. y Walker, J.M. eds., *Molecular Biomechanics Handbook* (Humana Press, Inc. 1998).

"Condiciones rigurosas de lavado de hibridación" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones de Southern y Northern son dependientes de secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Se encuentra una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993), supra, y en Hames y Higgins, 1 y 2. Las condiciones rigurosas de hibridación y lavado pueden determinarse fácilmente de forma empírica para cualquier ácido nucleico de ensayo. Por ejemplo, en la determinación de condiciones altamente rigurosas de hibridación y lavado, se aumentan gradualmente las condiciones de lavado e hibridación (por ejemplo, aumentando la temperatura, disminuyendo la concentración salina, aumentando la concentración de detergente y/o aumentando la concentración de disolventes orgánicos tales como formalina en la hibridación o lavado), hasta que se cumpla una serie seleccionada de criterios. Por ejemplo, las condiciones de hibridación y lavado se aumentan gradualmente hasta que una sonda se une a una diana complementaria completamente apareada con una proporción señal a ruido que es al menos 5x tan elevada como la observada para la hibridación de la sonda con una diana no apareada.

En general, una proporción señal a ruido de al menos 2x (o mayor, por ejemplo, al menos 5x, 10x, 20x, 50x, 100x, o más) la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. La detección de al menos hibridación rigurosa entre dos secuencias en el contexto de la presente descripción indica similitud estructural relativamente fuerte con, por ejemplo, los ácidos nucleicos proporcionados en la lista de secuencias de este documento.

Las condiciones "muy rigurosas" se seleccionan para igualar el punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para una sonda particular. La T<sub>m</sub> es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia de ensayo hibrida con una sonda perfectamente apareada. Para los propósitos de la presente descripción, generalmente, las condiciones "altamente rigurosas" de hibridación y lavado se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores a la T<sub>m</sub> para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos (como se indica a continuación, condiciones altamente rigurosas también pueden mencionarse en términos comparativos). Las secuencias diana que están muy relacionadas o son idénticas a la secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, "sonda") pueden identificarse en condiciones rigurosas o altamente rigurosas. Condiciones de rigurosidad inferior son apropiadas para secuencias que son menos complementarias.

Las condiciones "de rigurosidad ultra-elevada" de hibridación y lavado son aquellas en que la rigurosidad de las condiciones de hibridación y lavado se aumentan hasta que la proporción señal a ruido para la unión de una sonda a un ácido nucleico diana complementario perfectamente apareado es al menos 10x tan elevada como la observada para la hibridación a cualquier ácido nucleico diana no apareado. Un ácido nucleico diana que hibrida con una sonda en dichas condiciones, con una proporción señal a ruido de al menos la mitad de la del ácido nucleico diana complementario perfectamente apareado, se dice que se une a la sonda en condiciones de rigurosidad ultra-elevada.

En la determinación de condiciones rigurosas o altamente rigurosas de hibridación (o incluso hibridación más rigurosas) y lavado, se aumentan gradualmente las condiciones de hibridación y lavado (por ejemplo, aumentando la temperatura, disminuyendo la concentración salina, aumentando la concentración de detergente y/o aumentando la concentración de disolventes orgánicos, tales como formamida, en la hibridación o el lavado), hasta que se cumpla una serie seleccionada de criterios. Por ejemplo, las condiciones de hibridación y lavado se aumentan gradualmente hasta que una sonda que comprende una o más secuencias polinucleotídicas de la descripción, por ejemplo, secuencias o subsecuencias únicas seleccionadas entre las dadas en este documento (por ejemplo, SEQ ID Nos: 1-2) y/o secuencias polinucleotídicas complementarias, se une a una diana complementaria perfectamente apareada (de nuevo, un ácido nucleico que comprende una o más secuencias o subsecuencias de ácido nucleico seleccionadas entre las dadas en este documento y/o secuencias polinucleotídicas complementarias de las mismas), con una proporción señal a ruido que es al menos 2x (y opcionalmente 5x, 10x, o 100x o más) tan elevada como la observada para la hibridación de la sonda con una diana no apareada (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que comprende una o más secuencias o subsecuencias seleccionadas entre secuencias de la influenza conocidas presentes en bases de datos públicas tales como GenBank en el momento de la presentación, y/o secuencias polinucleotídicas complementarias de las mismas), según se desee.

Usando los polinucleótidos descritos en este documento o subsecuencias de los mismos, pueden obtenerse nuevos ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, dichos ácidos nucleicos diana incluyen secuencias que hibridan en condiciones rigurosas con una sonda oligonucleotídica única correspondiente a cualquiera de los polinucleótidos de, por ejemplo, las SEQ ID Nos: 1-2).

Asimismo, pueden determinarse niveles de rigurosidad incluso más elevados aumentando gradualmente las condiciones de hibridación y/o lavado del ensayo de hibridación relevante. Por ejemplo, aquellos en los que la rigurosidad de las condiciones de hibridación y lavado se aumentan hasta que la proporción señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico complementario perfectamente apareado es al menos 10X, 20X, 50X, 100X, o 500X o más tan elevada como la observada para la hibridación a cualquier ácido nucleico diana no apareado. La señal particular dependerá del marcador usado en el ensayo relevante, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador colorimétrico, un marcador radiactivo, o similares. Un ácido nucleico diana que hibrida con una sonda en

dichas condiciones, con una proporción señal a ruido de al menos la mitad de la del ácido nucleico diana complementario perfectamente apareado, se dice que se une a la sonda en condiciones de rigurosidad ultra-ultra-elevada.

- 5 Ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

10 Clonación, mutagénesis y expresión de biomoléculas de interés

10 Textos generales que describen técnicas de biología molecular, que son aplicables a la presente invención, tales como clonación, mutación, cultivo celular y similares, incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado a través de 2002) ("Ausubel"). Estos textos describen la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros asuntos relevantes relacionados con, por ejemplo, la generación de moléculas HA y/o NA, etc.

20 También se describen en este documento diversos tipos de mutagénesis, por ejemplo, para producir y/o aislar, por ejemplo, moléculas HA y/o NA nuevas o recién aisladas y/o para modificar/mutar adicionalmente los polipéptidos (por ejemplo, moléculas HA y NA como en las SEQ ID Nos: 11-12) descritos en este documento. Incluyen, aunque sin limitación, mutagénesis aleatoria dirigida al sitio, recombinación homóloga (arrastre de ADN), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida por oligonucleótido, mutagénesis de ADN modificado con fosforotioato, mutagénesis usando ADN dúplex con huecos o similares. Métodos adecuados adicionales incluyen reparación de desapareamientos puntuales, mutagénesis usando cepas hospedadoras deficientes de la reparación, selección por restricción y purificación por restricción, mutagénesis por delección, mutagénesis por síntesis génica total, reparación de rotura de la doble cadena, y similares. También se describe en este documento mutagénesis, por ejemplo, que implica construcciones químicas. La mutagénesis puede estar guiada por información conocida de la molécula de origen natural o molécula de origen natural alterada o mutada, por ejemplo, secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina o similares.

Los textos anteriores y los ejemplos encontrados en este documento describen estos procedimientos así como las siguientes publicaciones (y referencias citadas en las mismas): Sieber, et al., Nature Biotechnology, 19:436-460 (2001); Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, Anal Biochem 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the fosforotioate method, Methods Mol Biol 57:369-374 (1996); I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res 23, 3067-8 (1995); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, Science 242:240-245 (1988); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, Nucl Acids Res 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl Acids Res 16: 7207 (1988); Sakamar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the  $\alpha$ -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl Acids Res 14: 6361-6372 (1988); Sayers et al., Y-T Exonucleases in fosforotioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl Acids Res 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of fosforotioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) Nucl Acids Res 16: 803-814; Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, Methods in Enzymol 154: 382-403 (1987); Kramer y Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, Methods in Enzymol 154:350-367 (1987); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, en Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlín) (1987); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Methods in Enzymol 154, 367-382 (1987); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, Methods in Enzymol 154:329-350 (1987); Carter, Site-directed mutagenesis, Biochem J 237:1-7 (1986); Eghtedarzadeh y Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl Acids Res 14: 5115 (1986); Mandrecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis, Proc Natl Acad Sci USA, 83:7177-7181 (1986); Nakamaye y Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by fosforotioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl Acids Res 14: 9679-9698 (1986); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil Trans R Soc Lond A 317: 415-423 (1986); Botstein y Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, Science 229:1193-1201(1985); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, Nucl Acids Res 13: 4431-4443 (1985); Grundström et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl Acids Res 13: 3305-3316 (1985); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Proc Natl Acad Sci USA 82:488-492 (1985); Smith, In vitro mutagenesis, Ann Rev Genet 19:423-462(1985); Taylor et al., The use of fosforotioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl Acids Res 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using fosforotioate-

modified DNA, Nucl Acids Res 13: 8765-8787 (1985); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl Acids Res 12: 94441-9456 (1984); Kramer et al., Point Mismatch Repair, Cell 38:879-887 (1984); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned in M13 vectors, Methods in Enzymol 100:468-500 (1983); y Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, Nucl Acids Res 10:6487-6500 (1982). Pueden encontrarse detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores en Methods in Enzymol Volumen 154, que también describe controles útiles para solucionar problemas con diversos métodos de mutagénesis, aislamiento de genes, expresión, y otros métodos.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, para su uso en mutagénesis, por ejemplo, mutar bibliotecas de las moléculas HA y/o NA, o alterarlas, se sintetizan típicamente de forma química de acuerdo con el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts 22(20):1859-1862, (1981) por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984).

Además, puede encargarse esencialmente cualquier ácido nucleico personalizado o convencional de cualquiera de una diversidad 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. (Alameda, CA) y muchas otras. Asimismo, pueden encargarse péptidos y anticuerpos personalizados de cualquiera de una diversidad de fuentes, tales como PeptidoGenic (disponible en pkim@ccnet.com), HTI Bio-products, Inc. (www.htibio.com), BMA Biomedicals Ltd. (R.U.), Bio.Synthesis, Inc., y muchas otras.

En este documento también se describen células hospedadoras y organismos que comprenden una molécula HA y/o NA u otro polipéptido y/o ácido nucleico, por ejemplo, las SEQ ID Nos: 1-2. Las células hospedadoras se diseñan por ingeniería genética (por ejemplo, se transforman, transducen o transfectan con los vectores descritos en este documento, que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede ser, por ejemplo, en forma de un plásmido, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo, o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en células y/o microorganismos por métodos convencionales incluyendo electroporación (véase, From et al., Proc-Natl Acad Sci USA 82, 5824 (1985), infección por vectores virales, penetración balística a alta velocidad por pequeñas partículas con el ácido nucleico dentro de la matriz de pequeñas perlas o partículas, o sobre la superficie (Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)). Berger, Sambrook, y Ausubel proporcionan una diversidad de métodos apropiados de transformación. Véase, anteriormente.

Están disponibles varios métodos bien conocidos para introducir ácidos nucleicos diana en células bacterianas, cualquiera de los cuales puede usarse en la presente invención. Éstos incluyen: fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo de proyectiles, e infección con vectores virales, etc. Pueden usarse células bacterianas para amplificar la cantidad de plásmidos que contienen construcciones de ADN de esta invención. Las bacterias se cultivan hasta fase log y los plásmidos dentro de las bacterias pueden aislarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, está disponible una plétora de kits en el mercado para la purificación de plásmidos de bacterias (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™, de Stratagene; y, QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados después se manipulan adicionalmente para producir otros plásmidos, se usan para transfectar células o se incorporan en vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores opcionalmente comprenden casetes genéricos de expresión que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas, o procariotas, o ambos (por ejemplo, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas, u opcionalmente ambos. Véase, Giliman y Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, et al., Nature, 328:731 (1987); Schneider, B., et al., Protein Expr Purif 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (todos supra). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds.) publicado por la ATCC. También se encuentran procedimientos básicos adicionales para secuenciación, clonación y otros aspectos de biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes en Watson et al. (1992) Recombinant DNA Segunda Edición Scientific American Books, NY. Véase, anteriormente. Anteriormente se han ilustrado vectores adicionales útiles con las secuencias de este documento en la sección referente a la producción de virus influenza para vacunas y las referencias citadas en la misma.

#### Producción y recuperación de polipéptido

Después de la transducción de una línea o cepa celular hospedadora adecuada y el cultivo de las células hospedadoras hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce por un medio apropiado (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. En

algunas realizaciones, después se recupera un producto polipeptídico secretado, por ejemplo, un polipéptido HA y/o NA como en una forma de proteína de fusión secretada, etc., del medio de cultivo. En otras realizaciones, se produce una partícula viral de la invención que contiene una HA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11 y un polipéptido NA a partir de la célula. Como alternativa, las células pueden recogerse por centrifugación, alterarse por un medio físico o químico, y retenerse el extracto bruto resultante para purificación adicional. Las células eucariotas o microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden alterarse por cualquier método conveniente, incluyendo sonicación por ciclos de congelación-descongelación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisis celular, u otros métodos, que son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Además, las células que expresan un producto polipeptídico HA y/o a NA descrito en este documento pueden utilizarse sin separar el polipéptido de la célula. En dichas situaciones, el polipéptido se expresa opcionalmente sobre la superficie celular y se examina de este modo (por ejemplo, teniendo moléculas HA y/o NA (o por ejemplo, comprendiendo proteínas de fusión o similares) sobre la superficie celular de unión a anticuerpos, etc.

Los polipéptidos expresados pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes por cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas de marcaje conocidos para los especialistas en la técnica), cromatografía con hidroxilapatita, y cromatografía con lectina. Pueden usarse etapas de replegamiento proteico, según se desee, para completar la configuración de la proteína madura. Además, puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en las etapas de purificación finales. Además de las referencias indicadas en este documento, es bien conocida en la técnica una diversidad de métodos de purificación, incluyendo, por ejemplo, los expuestos en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bollag et al. (1996) *Protein Methods*. 2ª Edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.

Cuando los polipéptidos expresados se producen en virus, los virus se recuperan típicamente del medio de cultivo, en el que se han cultivado las células infectadas (transfectadas). Típicamente, el medio bruto se aclara antes de la concentración de los virus influenza. Los métodos comunes incluyen ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, el medio bruto de cultivos infectados puede primero aclararse por centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para retirar los desechos celulares y otra materia particulada grande, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Opcionalmente, el sobrenadante del medio aclarado después se centrifuga para sedimentar los virus influenza, por ejemplo, a 15,000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Después de la resuspensión del sedimento 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 (PBS) a pH 7,4, se concentra el virus por centrifugación en gradiente de densidad sobre sacarosa (60%-12%) o tartrato de potasio (50%-10%). Son adecuados gradientes continuos o por etapas, por ejemplo, un gradiente de sacarosa entre el 12% y el 60% en cuatro etapas del 12%. Los gradientes se centrifugan a una velocidad, y durante un tiempo, suficientes para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación. Como alternativa, y para la mayoría de las aplicaciones comerciales a gran escala, el virus se somete a elutriación a partir de gradientes de densidad usando un rotor de centrífuga zonal que funciona en modo continuo. Se proporciona detalles adicionales suficientes para guiar a los especialistas en la técnica a través de la preparación de virus influenza a partir de cultivo tisular, por ejemplo, en Furminger. *Vaccine Production*, en Nicholson et al. (eds.) *Textbook of Influenza* pág. 324-332; Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*, en Cohen y Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* pág. 141-151, y la patente de Estados Unidos nº 5.690.937. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80°C en presencia de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) como estabilizador.

Como alternativa, pueden emplearse sistemas de transcripción/traducción sin células para producir polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos o subsecuencia de, por ejemplo, las secuencias dadas en este documento tales como las SEQ ID Nos: 11-12, o codificadas por las secuencias polinucleotídicas de por ejemplo las SEQ ID Nos: 1-12. Están disponibles en el mercado varios sistemas adecuados de transcripción y traducción *in vitro*. Se encuentra una guía general para protocolos de transcripción y traducción *in vitro* en Tymms (1995) *In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology Volumen 37*, Garland Publishing, NY.

Además, los polipéptidos, o subsecuencias de los mismos, por ejemplo, subsecuencias que comprenden péptidos antigénicos, pueden producirse de forma manual o usando un sistema automatizado, por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (véase, Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc* 85:2149-2154). Los sistemas automatizados ejemplares incluyen el Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, CA). Si se desea, pueden sintetizarse químicamente subsecuencias por separado, y combinarse usando métodos químicos para proporcionar polipéptidos de longitud completa.

Aminoácidos modificados

Los polipéptidos expresados descritos en este documento pueden contener uno o más aminoácidos modificados. La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, (a) el aumento de la semi-vida sérica del polipéptido, (b) la reducción/aumento de la antigenicidad del polipéptido, (c) el aumento de la estabilidad en almacenamiento del polipéptido, etc. El o los aminoácidos se modifican, por ejemplo, de forma co-traducciona

o post-traducciona durante la producción recombinante (por ejemplo, glicosilación ligada a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos (por ejemplo, mediante PEGilación).

Ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranilgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEG-ilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado, y similares, así como aminoácidos modificados por conjugación con, por ejemplo, restos lipídicos u otros agentes orgánicos de derivatización. La bibliografía está repleta de referencias adecuadas para guiar a los especialistas en la técnica en la modificación de aminoácidos. Se encuentran ejemplos de protocolos en Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Human Press, Towata, NJ.

Proteínas de fusión

En este documento también se describen proteínas de fusión que comprenden fusiones de las secuencias descritas en este documento (por ejemplo, que codifican polipéptidos HA y/o NA ejemplificados por las SEQ ID Nos: 11-12) con, por ejemplo, inmunoglobulinas (o partes de las mismas), secuencias que codifican, por ejemplo, GFP (proteína fluorescente verde), u otros marcadores similares, etc. Las proteínas de fusión se usan opcionalmente para, por ejemplo, aplicaciones similares (incluyendo, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas, profilácticas, de diagnóstico, experimentales, etc. descritas en este documento) a las de las proteínas no de fusión descritas en este documento. Además de la fusión con secuencias de inmunoglobulina y secuencias marcadoras, las proteínas descritas en este documento también se fusionan opcionalmente con, por ejemplo, secuencias que permiten la clasificación de las proteínas de fusión y/o el direccionamiento de las proteínas de fusión a tipos celulares específicos, regiones, etc.

Anticuerpos

Los polipéptidos descritos en este documento pueden usarse para producir anticuerpos específicos para los polipéptidos dados en este documento y/o polipéptidos codificados por los polinucleótidos descritos en este documento y variantes conservativas de los mismos. Anticuerpos específicos para los polipéptidos mencionados anteriormente son útiles, por ejemplo, para propósitos de diagnóstico y terapéuticos, por ejemplo, relacionados con la actividad, distribución, y expresión de polipéptidos diana.

Pueden generarse anticuerpos específicos para los polipéptidos descritos en este documento por métodos bien conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos pueden incluir, aunque sin limitación, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab.

Los polipéptidos no requieren actividad biológica para la producción de anticuerpos (por ejemplo, no se requiere hemaglutinina o neuraminidasa funcional de longitud completa). Sin embargo, el polipéptido u oligopéptido debe ser antigénico. Los péptidos usados para inducir anticuerpos específicos típicamente tienen una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 4 aminoácidos, y a menudo al menos 5 ó 10 aminoácidos. Tramos cortos de un polipéptido pueden fusionarse con otra proteína, tal como hemocianina de lapa californiana, y producirse anticuerpos contra la molécula quimérica.

Numerosos métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales son conocidos para los especialistas en la técnica, y pueden adaptarse para producir anticuerpos específicos para los polipéptidos descritos en este documento, y/o codificados por las secuencias de poli-nucleótidos descritas en este documento, etc. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; Paul (ed.) (1998) Fundamental Immunology, Cuarta Edición, Lippincott-Raven, Lippincott Williams & Wilkins; Harlow y Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en el mismo; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY; y Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497. Otras técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos incluyen selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fágicos o similares. Véase, Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; y Ward, et al. (1989) Nature 341: 544-546. Anticuerpos y antiseros monoclonales y policlonales específicos habitualmente se unirán con una  $K_D$  de, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ , al menos aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  o mejor y, típicamente y al menos aproximadamente 0,001  $\mu\text{M}$  o mejor.

Para ciertas aplicaciones terapéuticas, son deseables anticuerpos humanizados. Pueden encontrarse métodos detallados para la preparación de anticuerpos quiméricos (humanizados) en la patente de Estados Unidos

5.482.856. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre la humanización y otras técnicas de producción y diseño de anticuerpos en Borrebaeck (ed.) (1995) *Antibody Engineering*. 2ª Edición Freeman and Company, NY (Borrebaeck); McCafferty et al. (1996) *Antibody Engineering. A Practical Approach* IRL en Oxford Press, Oxford, Inglaterra (McCafferty), y Paul (1995) *Antibody Engineering Protocols* Human Press, Towata, NJ (Paul). Pueden encontrarse detalles adicionales respecto a procedimientos específicos, por ejemplo, en Ostberg et al. (1983), *Hybridoma* 2: 361-367, Ostberg, patente de Estados Unidos nº 4.634.664, y Engelman et al., patente de Estados Unidos nº 4.634.666.

Definición de polipéptidos por inmunorreactividad

En este documento también se describe la generación de antisueros que se unen específicamente a los polipéptidos descritos en este documento así como los polipéptidos que se unen por dichos antisueros.

Por ejemplo, se describen polipéptidos (por ejemplo, moléculas HA y NA) que se unen específicamente a o que son específicamente inmunorreactivos con un anticuerpo o antisuero generado contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre una o más de las secuencias dadas en este documento (por ejemplo, SEQ ID Nos: 11-12), etc. Para eliminar la reactividad cruzada con otros homólogos, el anticuerpo o antisuero se sustrae con las moléculas HA y/o NA encontradas en bases de datos públicas en el momento de la presentación, por ejemplo, el o los polipéptidos de "control". Cuando las otras secuencias de control corresponden con un ácido nucleico, se genera un polipéptido codificado por el ácido nucleico y se usa para propósitos de sustracción del anticuerpo/antisuero.

En un formato típico, el inmunoensayo usa un antisuero policlonal que se creó contra uno o más polipéptidos que comprenden una o más de las secuencias correspondientes a las secuencias de este documento (por ejemplo, SEQ ID Nos: 11-12), etc. o una subsecuencia sustancial de las mismas (es decir, al menos aproximadamente el 30% de la secuencia de longitud completa proporcionada). La serie de inmunógenos polipeptídicos potenciales derivados de las presentes secuencias se mencionan colectivamente a continuación como "los polipéptidos inmunogénicos". El antisuero resultante se selecciona opcionalmente para que tenga reactividad cruzada contra los homólogos de control de hemaglutinina y/o neuraminidasa y se elimina cualquier dicha reactividad cruzada, por ejemplo, por inmunoabsorción, con uno o más de los homólogos de control de hemaglutinina y neuraminidasa, antes del uso del antisuero policlonal en el inmunoensayo.

Para producir antisueros para su uso en un inmunoensayo, se produce y se purifica uno o más de los polipéptidos inmunogénicos como se describe en este documento. Por ejemplo, puede producirse proteína recombinante en una célula recombinante. Se inmuniza una cepa endogámica de ratones (usada en este ensayo porque resulta ser más reproducible debido a la identidad genérica virtual de los ratones) con la proteína o proteínas inmunogénicas en combinación con un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo convencional de inmunización de ratones (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción convencional de generación de anticuerpos, formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica). En este documento también se encuentran referencias adicionales y un análisis de anticuerpos y pueden aplicarse aquí para definir polipéptidos por inmunorreactividad. Como alternativa, se conjuga uno o más polipéptidos sintéticos o recombinante derivados de las secuencias descritas en este documento con una proteína vehículo y se usa como inmunógeno.

Los sueros policlonales se recogen y titulan frente al polipéptido inmunogénico en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con una o más de las proteínas inmunogénicas inmovilizadas en un soporte sólido. Se seleccionan los antisueros policlonales con un título de  $10^6$  o mayor, se combinan y sustraen con los polipéptidos de control hemaglutinina y/o neuraminidasa para producir antisueros policlonales titulados combinados sustraídos.

Los antisueros policlonales titulados combinados sustraídos se ensayan para la reactividad cruzada contra el homólogo u homólogos de control en un inmunoensayo comparativo. En este ensayo comparativo, se determinan condiciones de unión discriminatorias para los antisueros policlonales titulados sustraídos que producen una proporción señal a ruido al menos aproximadamente 5-10 veces mayor para la unión de los antisueros policlonales titulados a los polipéptidos inmunogénicos en comparación con la unión a los homólogos de control. Es decir, la rigurosidad de la reacción de unión se ajusta por la adición de competidores no específicos tales como albúmina o leche en polvo desnatada, y/o ajustando las condiciones salinas, la temperatura, y/o similares. Estas condiciones de unión se usan en posteriores ensayos para determinar si un polipéptido de ensayo (un polipéptido que se está comparando con los polipéptidos inmunogénicos y/o los polipéptidos de control) se une específicamente por los antisueros policlonales sustraídos combinados. En particular, los polipéptidos de ensayo que muestran una proporción señal a ruido al menos 2-5x mayor que los homólogos receptores de control en condiciones de unión discriminatoria, y una proporción señal a ruido de al menos aproximadamente  $\frac{1}{2}$  en comparación con el o los polipéptidos inmunogénicos, comparten similitud estructural sustancial con el polipéptido inmunogénico en comparación con el receptor conocido, etc.

En otro ejemplo, se usan inmunoensayos en el formato de unión competitiva para la detección de un polipéptido de ensayo. Por ejemplo, como se indica, se retiran anticuerpos de reacción cruzada de la mezcla de antisueros combinados por inmunoabsorción con los polipéptidos de control. El o los polipéptidos inmunogénicos después se inmovilizan en un soporte sólido que se expone a los antisueros combinados sustraídos. Se añaden las proteínas de ensayo al ensayo para que compitan por la unión a los antisueros sustraídos combinados. La capacidad de la proteína o proteínas de ensayo de competir por la unión con los antisueros sustraídos combinados en comparación con la proteína o proteínas inmovilizadas se compara con la capacidad del o de los polipéptidos inmunogénicos añadidos al ensayo de competir por la unión (los polipéptidos inmunogénicos compiten de forma eficaz con los polipéptidos inmunogénicos inmovilizados por la unión a los antisueros combinados). Se calcula el porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas de ensayo, usando cálculos convencionales.

En un ensayo paralelo, se determina opcionalmente la capacidad de la proteína o proteínas de control de competir por la unión a los antisueros sustraídos combinados en comparación con la capacidad del o de los polipéptidos inmunogénicos de competir por la unión a los antisueros. De nuevo, se calcula el porcentaje de reactividad cruzada para el o los polipéptidos de control, usando cálculos convencionales. Cuando el porcentaje de reactividad cruzada se al menos 5-10x tan elevado para los polipéptidos de ensayo en comparación con el o los polipéptidos de control y o cuando la unión de los polipéptidos de ensayo está aproximadamente en el intervalo de la unión de los polipéptidos inmunogénicos, se dice que los polipéptidos de ensayo se unen específicamente a los antisueros sustraídos combinados.

En general, los antisueros inmunoabsorbidos y combinados pueden usarse en un inmunoensayo de unión competitiva como se describe en este documento para comparar cualquier polipéptido de ensayo con el o los polipéptidos inmunogénicos y/o de control. Para hacer esta comparación, los polipéptidos inmunogénicos, de ensayo y de control se ensayan cada uno a un amplio intervalo de concentraciones y se determina la cantidad de cada polipéptido necesaria para inhibir el 50% de la unión de los antisueros sustraídos a, por ejemplo, una proteína inmovilizada de control, de ensayo o inmunogénica usando técnicas convencionales. Si la cantidad del polipéptido de ensayo necesaria para la unión en el ensayo competitivo es menor de dos veces la cantidad del polipéptido inmunogénico que se requiere, entonces se dice que el polipéptido de ensayo se une específicamente a un anticuerpo generado contra la proteína inmunogénica, siempre que la cantidad sea al menos aproximadamente 5-10x tan elevada como para el polipéptido de control.

Como determinación adicional de la especificidad, los antisueros combinados se inmunoabsorben por completo opcionalmente con el o los polipéptidos inmunogénicos (en lugar del o de los polipéptidos de control) hasta que se detecta poco o nada de unión del antisuero combinado sustraído de polipéptido inmunogénico resultante con el o los polipéptidos inmunogénicos usados en la inmunoabsorción. Este antisuero completamente inmunoabsorbido después se ensaya para la reactividad con el polipéptido de ensayo. Si se observa poca o ninguna reactividad (es decir, no más de 2x la proporción señal a ruido observada para la unión del antisuero completamente inmunoabsorbido con el polipéptido inmunogénico), entonces el polipéptido de ensayo se une específicamente por el antisuero producido por la proteína inmunogénica.

#### Variantes de secuencia de ácidos nucleicos y polipéptidos

##### Variantes silenciosas

Debido a la degeneración del código genético, se produce opcionalmente cualquiera de una diversidad de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos descritos en este documento, algunas de las cuales pueden albergar niveles inferiores de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico y polipeptídicas de HA y NA de este documento. A continuación se proporciona una tabla de codones típica que especifica el código genético, encontrada en muchos textos de biología y bioquímica.

**Tabla 1**

Tabla de codones						
Aminoácidos			Codón			
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU		
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU		
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG		
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU		
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
Histidina	His	H	CAC	CAU		
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
Lisina	Lys	K	AAA	AAG		
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC
Metionina	Met	M	AUG			CUU
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU		
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG		
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
Triptófano	Trp	W	UGG			
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU		

5 La tabla de codones muestra que muchos aminoácidos están codificados por más de un codón. Por ejemplo, los codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, y CGU codifican todos el aminoácido arginina. Por tanto, en cualquier posición en los ácidos nucleicos descritos en este documento donde se especifica una arginina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos anteriormente sin alterar el polipéptido codificado. Se entiende que U en una secuencia de ARN corresponde a T en una secuencia de ADN.

10 Dichas "variaciones silenciosas" son una especie de "variaciones modificadas de forma conservativa", analizadas a continuación. Un especialista en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto ATG, que es normalmente el único codón para metionina, y TTG, que es normalmente el único codón para triptófano) puede modificarse por técnicas convencionales para que codifique un polipéptido funcionalmente idéntico. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cualquier  
 15 secuencia descrita. La descripción, por lo tanto, proporciona de forma explícita todas y cada una de las posibles variaciones de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en este documento que podría hacerse seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codón. Estas combinaciones se hacen de acuerdo con el código genético convencional de tripletes (por ejemplo, como se expone en la Tabla 1, o como está habitualmente disponible en la técnica) aplicado a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido hemaglutinina o neuraminidasa descrito en este documento. Todas estas variaciones de cada ácido nucleico de este documento se proporcionan y describen específicamente por consideración de la secuencia en combinación con el código genético. Un especialista en la técnica es completamente capaz de hacer estas sustituciones silenciosas usando los métodos de este documento.

#### 25 Variaciones conservativas

Debido a la degeneración del código genético, las "sustituciones silenciosas" (es decir, sustituciones en una secuencia de ácido nucleico que no provocan una alteración en un polipéptido codificado) son una característica implícita de cada secuencia de ácido nucleico descrita en este documento que codifica un aminoácido.

30 "Variaciones conservativas" de una secuencia de ácido nucleico particular se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas. Finalmente, la adición de secuencias que no alteran la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico, tal como la adición de una secuencia no funcional, es una variación conservativa del ácido nucleico básico.

#### 35 Subsecuencias polipeptídicas y polinucleotídicas únicas

En este documento también se describe un ácido nucleico que comprende una subsecuencia única en un ácido nucleico seleccionado de la secuencia de moléculas HA y NA descritas en este documento, por ejemplo, las SEQ ID Nos: 1-2. La subsecuencia única es única en comparación con ácidos nucleicos correspondientes a ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, los encontrados en GenBank u otras bases de datos públicas similares en el momento de la presentación. La alineación puede realizarse usando, por ejemplo, BLAST establecido a parámetros por defecto.

Cualquier subsecuencia única es útil, por ejemplo, como sonda para identificar los ácidos nucleicos descritos en este documento. Véase, anteriormente.

5 Asimismo, se describe un polipéptido que comprende una subsecuencia única en un polipéptido seleccionado entre la secuencia de moléculas HA y NA descritas en este documento, por ejemplo, las SEQ ID Nos: 11-12. Aquí, la subsecuencia única es única en comparación con un polipéptido correspondiente a, por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a secuencias polinucleotídicas encontradas en, por ejemplo, GenBank u otras bases de datos públicas similares en el momento de la presentación.

10 Se describen adicionalmente ácidos nucleicos diana que hibridan en condiciones rigurosas con un oligonucleótido codificante único que codifica una subsecuencia única en un polipéptido seleccionado entre las secuencias de moléculas HA y NA descritas en este documento donde la subsecuencia única es única en comparación con un polipéptido correspondiente a cualquiera de los polipéptidos de control (secuencias de, por ejemplo, los ácidos nucleicos correspondientes a los encontrados en, por ejemplo, GenBank u otras bases de datos públicas similares en el momento de la presentación). Las secuencias únicas se determinan como se ha indicado anteriormente.

#### Identidad y homología de comparación de secuencia

20 Las expresiones "idénticas" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoácídicos o nucleótidos que son iguales, en comparación y alineados para la máxima correspondencia, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencia descritos a continuación (u otros algoritmos disponibles para los especialistas en la técnica) o por inspección visual.

25 La expresión "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos (por ejemplo, ADN que codifica una molécula HA o NA, o la secuencia de aminoácidos de una molécula HA o NA) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente un 90%, preferiblemente un 91%, más preferiblemente un 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% o mayor identidad de nucleótidos o restos aminoácídicos, en comparación y alineados para la máxima correspondencia, medida usando un algoritmo de comparación de secuencia o por inspección visual. Dichas secuencias "sustancialmente idénticas" se considera típicamente que son "homólogas," sin referencia a un linaje real. Preferiblemente, existe "identidad sustancial" sobre una región de las secuencias de aminoácidos que e de al menos aproximadamente 200 restos de longitud, más preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 250 restos, y más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 300 restos, 350 restos, 400 restos, 425 restos, 450 restos, 475 restos, 480 restos, 490 restos, 495 restos, 499 restos, 500 restos, 502 restos, 559 restos, 565 restos, o 566 restos, o sobre la longitud completa de las dos secuencias a comparar.

40 Para la comparación de secuencias y la determinación de homología, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, se introducen las secuencias de ensayo y referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con relación de la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados.

45 Puede realizarse una alineación óptima de secuencias para la comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv Appl Math 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J Mol Biol 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por inspección visual (véase en líneas generales, Ausubel et al., supra).

55 Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990). El software para ejecutar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias con elevada valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que aparean o satisfacen algún valor umbral valorado positivo T cuando se alienan con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral del valor de la palabra vecina (véase, Altschul et al., supra). Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para hallar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra después se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para todo lo que pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor de recompensa para un par de restos de apareamiento; siempre > 0) y N (valor de penalización para restos de desapareamiento; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valoración para calcular el valor acumulativo. Los aciertos de extensión de palabra en cada

dirección se interrumpen cuando: el valor de alineación acumulativo disminuyen en la cantidad X desde su valor máximo conseguido; el valor acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con valoración negativa; o cuando se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una previsión (E) de 10, un límite de 100, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una previsión (E) de 10, y la matriz de valoración BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff (1989) Proc Natl Acad Sci USA 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc Natl Acad Sci USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual ocurriría por causalidad un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es de menos de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

Otro ejemplo de un algoritmo de alineación de secuencia útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-360. El método usado es similar al método descrito por Higgins y Sharp (1989) CABIOS5:151-153. El programa puede alinear, por ejemplo, hasta 300 secuencias de una longitud máxima de 5.000 letras. El procedimiento de alineación múltiple empieza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo después puede alinearse con la siguiente secuencia o grupo de secuencias alineadas más relacionado. Puede alinearse dos grupos de secuencias por una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue por una serie de alineaciones progresivas por pares. El programa también puede usarse para representar un dendograma o representación en árbol de las relaciones de agrupamiento. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencia.

Un ejemplo adicional de un algoritmo que es adecuado para múltiples alineaciones de secuencia de ADN, o aminoácidos es el programa CLUSTALW (Thompson, J. D. et al. (1994) Nucl. Acids. Res. 22: 4673-4680). CLUSTALW realiza múltiples comparaciones por pares entre grupos de secuencias y los ensambla en una alineación múltiple basada en homología. Las penalizaciones por Abrir hueco y Extensión de hueco pueden ser, por ejemplo, 10 y 0,05 respectivamente. Para alineaciones de aminoácidos, puede usarse el algoritmo BLOSUM como matriz de peso de proteína. Véase, por ejemplo, Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.

### Sistemas digitales

En este documento se describen adicionalmente sistemas digitales, por ejemplo, ordenadores, medios legibles en ordenador y sistemas integrados que comprenden cadenas de caracteres correspondientes a la información de secuencia de este documento para los ácidos nucleicos y los polipéptidos aislados o recombinantes de este documento, incluyendo, por ejemplo, las secuencias mostradas en este documento, y las diversas sustituciones silenciosas y sustituciones conservativas de las mismas. Los sistemas integrados pueden incluir adicionalmente, por ejemplo, un equipo de síntesis génica para preparar genes correspondientes a las cadenas de caracteres.

Pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica para detectar homología o similitud entre diferentes cadenas de caracteres (véase, anteriormente), o pueden usarse para realizar otras funciones deseables tales como controlar los archivos de salida, proporcionar la base para hacer presentaciones de información incluyendo las secuencias y similares. Ejemplos incluyen BLAST, analizado supra. Los sistemas informáticos pueden incluir dichos programas, por ejemplo, junto con uno o más archivos de datos o bases de datos que comprenden una secuencia indicada en este documento.

Por tanto, pueden detectarse y reconocerse diferentes tipos de homología y similitud de diversa rigurosidad y longitud entre diversas secuencias o fragmentos de HA o NA, etc. en los sistemas integrados de este documento. Por ejemplo, se han diseñado muchos métodos de determinación de homología para análisis comparativo de secuencias de biopolímeros, para revisión ortográfica en el tratamiento de textos, y para la recuperación de datos de diversas bases de datos. Como una comprensión de interacciones complementarias por pares de doble hélice entre 4 nucleobases principales en polinucleótidos natural, también pueden usarse modelos que estimulan la hibridación de cadenas polinucleotídicas homólogas complementarias como fundamento de alineación de secuencia u otras operaciones típicamente realizadas sobre las cadenas de caracteres correspondientes a las secuencias de este documento (por ejemplo, manipulaciones de tratamiento de textos, construcción de figuras que comprenden cadenas de caracteres de secuencia o subsecuencia, tablas de salida, etc.).

Por tanto, pueden adaptarse aplicaciones de escritorio convencionales tales como software de tratamiento de textos (por ejemplo, Microsoft Word™ o Corel Word-Perfect™) y software de bases de datos (por ejemplo, software de hojas de cálculo tales como Microsoft Excel™, Corel Quattro Pro™, o programas de bases de datos tales como Microsoft Access™, Paradox™, Gene Works™, o Mac Vector™ u otros programas similares) introduciendo una  
 5 cadena de caracteres correspondiente a uno o más polinucleótidos y polipéptidos descritos en este documento (ácidos nucleicos o proteínas, o ambos). Por ejemplo, un sistema puede incluir el software anterior que tiene la información de cadena de caracteres apropiada, por ejemplo, usada junto con una interfaz de usuario (por ejemplo, una GUI en un sistema operativo convencional tal como un sistema Windows, Macintosh o LINUX) para manipular  
 10 cadenas de caracteres correspondientes a las secuencias de este documento. Como se ha indicado, también pueden incorporarse programas especializados de alineación tales como BLAST en los sistemas descritos en este documento para la alineación de ácidos nucleicos o proteína (o cadenas de caracteres correspondientes).

Los sistemas descritos en este documento típicamente incluyen un ordenador digital con series de datos introducidas en el sistema de software que comprende cualquiera de las secuencias de este documento. El  
 15 ordenador puede ser, por ejemplo, un PC (sistema basado en Intel x86 o Pentium chip- compatible DOS™, OS2™ WINDOWS™ WINDOWSNT™, WINDOWS95™, WINDOWS2000™, WINDOWS98™, LINUX, un MACINTOSH™, Power PC, o un sistema basado en UNIX (por ejemplo, puesto de trabajo SUN™)) u otro ordenador disponible en el mercado que sea conocido para un especialista en la técnica. Está disponible el software para alinear o manipular de otro modo secuencias, o puede construirlo fácilmente un especialista en la técnica usando un lenguaje de  
 20 programación convencional tal como Visualbasic, PERL, Fortran, Basic, Java, o similares.

Cualquier controlador u ordenador opcionalmente incluye un monitor que a menudo es una pantalla de tubo de rayos catódicos ("CRT"), una pantalla de panel plano (por ejemplo, una pantalla de cristal líquido de matriz activa, pantalla de cristal líquido), u otras. La circuitería del ordenador a menudo se coloca en una caja que incluye numerosos chips de circuito integrados, tal como un microprocesador, memoria, circuitos de interfaz, y otros. La caja también incluye  
 25 opcionalmente una unidad de disco duro, una unidad de disquete, una unidad extraíble de alta capacidad tal como un CD-ROM grabable, y otros elementos periféricos comunes. Los dispositivos de entrada tales como un teclado o ratón opcionalmente proporcionan entradas por un usuario y para la selección por parte del usuario de secuencias a comparar o manipular de otro modo en el sistema informático relevante.

El ordenador típicamente incluye un software apropiado para recibir instrucciones del usuario, en forma de entrada por un usuario en una serie de campos de parámetros, por ejemplo, en una GUI, o en forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo, preprogramadas para una diversidad de diferentes operaciones específicas. El software entonces convierte estas instrucciones en el lenguaje apropiado para instruir la operación, por ejemplo, de  
 30 mecanismos apropiados o controladores de transporte para realizar la operación deseada. El software también puede incluir elementos de salida para controlar la síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo, basados en una secuencia o una alineamiento de secuencias de este documento), comparaciones de muestras para expresión génica diferencial, u otras operaciones.

#### Kits y reactivos

En este documento también se describe un kit. Por ejemplo, un kit contiene uno o más ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, o líneas celulares descritos en este documento (por ejemplo, que comprende, o con, una molécula HA y/o NA descrita en este documento). El kit puede contener un ácido nucleico o polipéptido de diagnóstico, por ejemplo, anticuerpo, serie de sondas, por ejemplo, como una micro-serie de ADNc envasada en una  
 45 recipiente adecuado, u otro ácido nucleico tal como uno o más vectores de expresión. El kit también puede comprender adicionalmente, uno o más reactivos adicionales, por ejemplo, sustratos, marcadores, cebadores, para el marcaje de productos de expresión, tubos y/u otros accesorios, reactivos para recoger muestras, tampones, cámaras de hibridación, cubreobjetos, etc. El kit opcionalmente comprende adicionalmente una serie de instrucciones o manual del usuario que detalla los métodos preferidos para usar los componentes del kit para el descubrimiento o aplicación de series de diagnóstico, etc.

Cuando se usa de acuerdo con las instrucciones, el kit puede usarse, por ejemplo, para evaluar una patología o afección, para evaluar efectos de un agente farmacéutico u otra intervención de tratamiento sobre el progreso de una patología o afección en una célula u organismo, o para su uso como vacuna, etc.

En este documento se describen adicionalmente kits de sistema que incorporan los métodos, composición, sistemas y aparato de este documento. Los kits de sistema comprenden opcionalmente uno o más de los siguientes: (1) un aparato, sistema, componente de sistema o componente de aparato; (2) instrucciones para poner en práctica los métodos descritos en este documento, y/o para hacer funcionar el aparato o componentes de aparato de este documento y/o para  
 60 usar las composiciones de este documento. También describe el uso de cualquier aparato, componente de aparato, composición o kit de este documento, para la práctica de cualquier método o ensayo de este documento, y/o para el uso de cualquier aparato o kit para la práctica de cualquier ensayo o método de este documento.

Además, los kits pueden incluir uno o más sistemas de traducción como se ha indicado anteriormente (por ejemplo, una célula) con material de envasado apropiado, recipientes para albergar los componentes del kit, materiales de instrucción para poner en práctica los métodos de este documento y/o similares. Asimismo, los productos de los

sistemas de traducción (por ejemplo, proteínas tales como las moléculas HA y/o NA) pueden proporcionarse en forma de kit, por ejemplo, con recipientes para albergar los componentes del kit, materiales de instrucción para poner en práctica los métodos de este documento y/o similares.

- 5 Para facilitar el uso de los métodos y composiciones de la invención, puede envasarse cualquiera de los componentes y/o composiciones de vacuna, por ejemplo, virus reagrupado en fluido alantoideo, etc., y componentes adicionales, tales como, tampón, células, medio de cultivo, útiles para el empaquetamiento e infección de virus influenza para propósitos experimentales o de vacuna terapéutica, en forma de un kit. Típicamente, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para  
10 realizar los métodos de la invención, material de envasado, y un recipiente.

## Ejemplos

### Construcción y análisis de virus y vacunas H5N1 *ca*

- 15 Se usaron diversas secuencias de este documento que comprenden secuencias HA/NA H5N1 para crear virus influenza y vacunas. Las secuencias HA en dichas vacunas se alteraron a partir del tipo silvestre por eliminación del sitio de escisión polibásico dentro de la HA. Las secuencias HA/NA se reagruparon (en un reagrupado 6:2) con A/AA/6/60 (un virus *att, ca*, véase anteriormente).

- 20 Se usaron tres cepas de influenza H5N1 en este ejemplo: A/VN/1203/2004, A/HK/491/97, y A/HK/213/2003. Dichas cepas también se mencionan en este ejemplo como las cepas '97, '03, y '04 basadas en sus años de designación. El porcentaje de similitud de los genes de HA de estas tres cepas es del 95-96%. La Figura 1 ilustra la modificación del sitio de escisión polibásico de una secuencia HA ejemplar, las secuencias HA '04, usadas para construir los virus/vacunas. Como se ha indicado previamente, diversas realizaciones de la invención comprenden secuencias  
25 que tienen diferentes regiones del sitio de escisión polibásico eliminadas. Véase anteriormente.

- Como se ha indicado, las secuencias H5N1 modificadas (es decir, los '97, '03, y '04 modificados) se usaron para construir virus reagrupados 6:2 con A/AA/6/60. Se apreciará, y se señala en otra parte de este documento, que también podrían usarse otras estructuras deseables (por ejemplo, PR8, etc.).

- 30 En los reagrupados 6:2 de este ejemplo, las secuencias génicas HA y NA se obtuvieron del virus parental de tipo silvestre y los genes restantes se caracterizaron por análisis de secuencia derivada del virus parental A/AA/6/60 *ca*. Los virus reagrupados se replicaron a 8,0-8,5 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> en huevos. Sin embargo, se apreciará que un virus reivindicado en el que log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> está comprendido entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, entre  
35 aproximadamente 7,5-8,5, o entre aproximadamente 8,0-8,5 también es parte de la invención. La capacidad de escisión de la HA modificada en los virus construidos por proteasas endógenas se restringió *in vitro* y los virus fueron dependientes de tripsina (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1,0 µg/ml) para el cultivo. Los virus construidos fueron sensibles a la temperatura *in vitro*.

- 40 Los virus reagrupados H5N1 *ca* (que tienen los genes HA '97, '03, o '04) fueron no elevadamente patogénicos para pollos. Por ejemplo, cuando se inocularon pollos Plymouth Rock blancos SPF de cuatro semanas de edad por vía intravenosa con una dilución 1:10 de virus de reserva (10<sup>8-8,75</sup> TCID<sub>50</sub>/ml) y se observaron durante 10 días, se observó que morían 8 de 8 pollos en 1-2 días cuando se usaban H5N1 '97, '03, y '04, mientras que morían 0 de 8 pollos cuando se usaban virus reagrupados H5N1 *ca*. Como puede observarse en la Figura 2, los virus reagrupados  
45 H5N1 *ca* administrados por vía intranasal no se replicaban en pollos.

- Los reagrupados H5N1/AA *ca* tampoco fueron letales para ratones. Véase la Figura 3, que también muestra la TCID<sub>50</sub> para las cepas de tipo silvestre H5N1. La Figura 4 muestra que los virus reagrupados H5N1 *ca* 1997 y 2004 estaban restringidos en la replicación en ratones. La Figura 5, muestra que los virus reagrupados H5N1 *ca* están restringidos en la replicación en pulmones de ratones.

- Se muestra una comparación de los títulos de anticuerpos HAI séricos producidos en ratones después de una única dosis intranasal de vacuna (2003 *ca* en comparación con 2003 de tipo silvestre), en la Figura 6. La Figura 7 muestra mediciones similares, pero usando títulos de anticuerpos neutralizantes séricos.

- 55 La Figura 8 presenta que los virus reagrupados H5N1 *ca* protegen a los ratones de la exposición letal con 50, 500, o 5,000 LD<sub>50</sub> de virus H5N1 de tipo silvestre. La Figura 9 muestra la eficacia de protección contra la replicación pulmonar de virus homólogos y heterólogos de exposición H5N1 en ratones. Como puede observarse, los reagrupados *ca* se replicaban menos bien que los virus de tipo silvestre. La Figura 10 muestra datos relacionados usando tractos respiratorios superiores de ratones. Los especialistas en la técnica estarán familiarizados con exposiciones homólogas y heterólogas (por ejemplo, ensayo de si las vacuna 2003 protege contra una exposición de 2003 de tipo silvestre (homóloga) o si una vacuna 2003 protege contra una exposición de 1997 de tipo silvestre (heteróloga), etc.).

- 65 La Figura 11 muestra la eficacia de protección conferida por una vacuna 2004 H5N1 *ca* contra exposición de alta dosis (10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>) con virus homólogos o heterólogos H5N1 de tipo silvestre en ratones. La Figura 12 muestra la eficacia de

protección conferida por vacunas H5N1 ca 1997 y 2003 contra exposición de alta dosis ( $10^5$ TCID<sub>50</sub>) con virus homólogos y heterólogos H5N1 de tipo silvestre en ratones. La Figura 13 muestra la eficacia de protección conferida por la vacuna 2004 H5N1 ca contra dosis bajas o altas de exposición con virus homólogo H5N1 de tipo silvestre en ratones. Las Figuras 11-13 demuestran que las vacunas ensayadas podían proteger contra otros virus relacionados.

5 El presente ejemplo demuestra varios puntos referentes a virus/vacunas reagrupados H5N1 ca ejemplares de la invención. Los virus modificados '97, '03, y '04 ca reagrupados demostraron tener fenotipo *ts in vitro*, pérdida de patogenicidad en pollos y atenuación en ratones. Se espera que la atenuación también esté presente en hurones. También se muestra eficacia de protección y protección cruzada contra exposición letal y propagación sistémica con virus de tipo silvestre en ratones. También se espera eficacia de protección y protecciones cruzadas contra la replicación de virus de exposición de tipo silvestre en el tracto respiratorio de ratones.

10 Se contempla usar estos (y similares) virus/vacunas para determinar si se mejora la inmunogenicidad y eficacia después de 2 dosis de vacuna; evaluar la inmunogenicidad en primates no humanos; evaluar la atenuación y la eficacia de vacuna en hurones; determinar la contribución de la inmunidad humoral y celular a la eficacia observada de las vacunas producidas en ratones; determinar qué restos de la HA 2003 contribuyen a la inmunogenicidad potenciada e introducirlos en HA 1997 y 2004; y determinar los efectos de delecionar el sitio de escisión de aminoácidos multibásico y la constelación génica.

20 **Secuencias**

A/Vietnam/1203/04

Secuencia de nucleótidos de A/Vietnam/1203/04 H5 (SEQ ID No: 1) Longitud de la molécula completa: 1767 nt

```

1 agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt
51 ttgcaatagt cagtcttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat
101 gcaaacaact cgacagagca ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac
151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa gaaacacaac gggaaactct
201 gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg tagcgtagct
251 ggatggctcc tcggaaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga
301 atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agtcaatgac ctctgttacc
351 caggggattt caatgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata
401 aaccattttg agaaaattca gatcatcccc aaaagttctt ggtccagtca
451 tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg tccataccag ggaaagtccct
501 cctttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag tacatacca
551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggtact
601 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aagctctatc
651 aaaacccaac cacctatatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga
701 ttggtaccaa gaatagctac tagatccaaa gtaaacgggc aaagtggaag
751 gatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc gaatgatgca atcaacttcg
801 agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag
851 aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa
901 caccaagtgt caaactccaa tgggggagat aaactctagc atgccattcc
951 acaatataca ccctctcacc attggggaat gcccacaata tgtgaaatca
1001 aacagattag tccttgcgac tgggctcaga aatagccctc aaagagagac
1051 tcgaggatta tttggagcta tagcaggttt tatagagggg ggtggcagg
1101 gaatggtaga tgggtgggat ggggtaccacc atagcaatga gcaggggagt
1151 gggtagcgtg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac
1201 caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg
1251 ttggaaggga atttaacaac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag
1301 aagatggaag acgggttcct agatgtctgg acttataatg tgaacttct
1351 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaatgtca
1401 agaaccctta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa tgcaaaggag
1451 ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcat aaatgtgata atgaaatgat
1501 ggaaagtgta agaaatggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag
1551 cgagactaaa aagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatagga
1601 atttaccaaa tactgtcaat ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact
1651 ggcaatcatg gtagctggtc tatccttatg gatgtgctcc aatgggtcgt
1701 tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt gtagttaaaa
1751 acacccttgt ttctact
    
```

ES 2 394 033 T3

Secuencia de aminoácidos de A/Vietnam/1203/04 H5 (SEQ ID No: 11) Longitud de la molécula completa: 564 aa

```

1 mekiVllfai vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
51 kkhngklcdl dgvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekan
101 pvnldlcygpd fndyeelkhl lsrinhfeki qiipksswss heaslgvssa

151 cpyqgkssff rnvvlikkn styptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
201 aeqtKlyqnp ttyisvgtst lnqrlvpria trskvngqsg rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsti mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hplrtigecpk yvksnrlvla tglrnspqre trglfgaiag
351 fieggwqgmV dgwygyhhsn eqgsgyaadk estqkaidgv tnkvnsiidk
401 mntqfeavgr efnnerrie nlnkkmedgf ldvwtynaEl lVlmenertl
451 dfhdsnvknl ydkvrlqlrd nakelgngcf efyhkcdnec mesvrngtyd
501 ypyseearl kreeisgvkl esigiyqils iystvassla laimvaglsI
551 wmcSngslqc rici

```

5 Secuencia de nucleótidos de A/Vietnam/1203/04 N1 (SEQ ID No: 2) Longitud de la molécula completa: 1398 nt

```

1 agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatc
51 ggggtcaatct gtatggtaac tggaaatagtt agcttaatgt tacaattgg
101 gaacatgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca gggaatcaac
151 accaatctga accaatcagc aataactaatt ttcttactga gaaagctgtg
201 gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaacggatg
251 ggctgtatac agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aagggggatg
301 tgtttgttat aagagagccg ttcattctcat gctcccactt ggaatgcaga
351 actttctttt tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc actccaatgg
401 gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt tgtcctgtgg
451 gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
501 gcaagtgtct gccatgatgg caccagttgg ttgacgattg gaatttctgg
551 cccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag
601 aactatcaa gagttggagg aacaacatac tgagaactca agagtctgaa
651 tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact gtaatgactg acggaccaag
701 taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa gggaaagtgg
751 ttaaactcagt cgaattggat gtccttaatt atcactatga ggaatgctcc
801 tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca
851 tggctcaaat cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaa
901 taggatatat atgcagtgga gtttccggag acaatccaacg cccaatgat
951 ggaacaggta gttgtggctc ggtgtcctct aacggggcat atggggtaaa
1001 aggggttttca tttaaatacg gcaatgggtg ctggatcggg agaaccaaaa
1051 gcaactaatc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
1101 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac
1151 tgattgggtca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag
1201 gactagattg cataagacct tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg
1251 cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg agcagcatat ctttttgtgg
1301 tgtaaatagt gacactgtgg gttggctctg gccagacggg gctgagttgc
1351 cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa aaactccttg tttctact

```

Secuencia de aminoácidos de A/Vietnam/1203/04 N1 (SEQ ID No: 12) Longitud de la molécula completa: 449 aa

1 mnpnqkiiti gsicmvtgiv slmlqignmi siwvshsiht gnqhqsepis  
 51 ntnfltekav asvklagnss lcpingwavy skdnsirigs kgdvvfirep  
 101 fiscshlecr tffltqgall ndkhsngtvk drsphrtlms cpvgeapsy  
 151 nsrfesvaws asachdgtsw ltigisgpdn gavavlkyng iitdtikswr

201 nnilrtqese cacvngscft vmtdgpsngq ashkifkmeq gkvvksveld  
 251 apnyhyeecs cypnageitc vcrdnwhgsn rpwvsfnqnl eyqigyicsg  
 301 vfgdnprpnd gtgscgpvss ngaygvkgfs fkyngvwig rtkstnsrsg  
 351 femiwdpngw tetdssfsvk qdivaitdws gysgsfvqhp eltgldcirp  
 401 cfwvelirgr pkestiwtsg ssisfcgvns dtvgwswpdg aelpftidk

A/Hong Kong/213/03

5 Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/213/03 H5 (SEQ ID No: 3) Longitud de la molécula completa: 1767 nt

1 agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt  
 51 ttgcaatagt cagtcttgtt aaaagtgatc agatttgcac tgggtaccat  
 101 gcaaacact cgacagagca ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac  
 151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac gggaaactct  
 201 gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg tagtgtagct  
 251 ggatggctcc tcggaaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga  
 301 atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agccaatgac ctctgttacc  
 351 caggggattt caacgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata  
 401 aaccattttg agaaaattca gatcatcccc aaaaattctt ggtccagtca  
 451 tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg tccataccaa ggaaagtctt  
 501 cctttttcag gaatgtggta tggcttatca aaaagaacaa tgcataccca  
 551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggattt  
 601 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagact aggctctatc  
 651 aaaaccaac cacctacatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga  
 701 ttggtaccaa aaatagctac tagatccaaa gtaaaccggc aaaatggaag  
 751 gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc gaatgatgca atcaacttcg  
 801 agagcaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag  
 851 aaaggggact cagcaattat gaaaagtgaa ttggaatatg gtaactgcaa  
 901 caccaagtgt caaactccaa tgggggcat aaactctagt atgccattcc  
 951 acaatataca ccctctcacc atcggggaat gccccaata tgtgaaatca  
 1001 aacagattag tccttgcgac tgggctcaga aatagccctc aaagagagac  
 1051 tcgaggatta tttggagcta tagcaggttt tatagaggga ggatggcagg  
 1101 gaatggtaga tgggtggtat gggtagcacc atagcaatga gcaggggagt  
 1151 gggtagcgtg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcc  
 1201 caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg  
 1251 ttggaaggga atttaataac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag  
 1301 aagatggaag acggattcct agatgtctgg acttataatg ctgaacttct  
 1351 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaatgtca  
 1401 agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa tgcaaaggag  
 1451 ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcac aaatgtgata atgaatgtat  
 1501 ggaaagtgta agaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag  
 1551 caagactaaa aagagaggaa ataagtggag taaaatgga gtcaatagga  
 1601 acttaccaaa tactgtcaat ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact  
 1651 ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg gatgtgctcc aatgggtcgt  
 1701 tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt gtagttaaaa  
 1751 acacccttgt ttctact

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/213/03 H5 (SEQ ID No: 13) Longitud de la molécula completa: 564 aa

ES 2 394 033 T3

```

1 mekivllfai vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
51 kthngklcdl dgvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekan
101 pandlcypgd fndyeelkhl lsrinhfeki qiipknsyss heaslgvssa
151 cpyqgkssff rnvvwlkkn nayptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
201 aeqrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvpkia trskvngqng rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgsai mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrnspqre trglfgaiag
351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eggsgyaadk estqkaidgv tnkvnsiidk
401 mntqfeavgr efnlerrie nlnkkmedgf ldvwtyna el lvmenertl
451 dfhdsvknk ydkvrlqlrd nakelgngcf efyhkcdnec mesvrngtyd
501 ypqyseearl kreeisgvkl esigtyqils iystvassla laimvagls1
551 wmcnsgslqc rici

```

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/213/03 N1 (SEQ ID No: 4) Longitud de la molécula completa: 1458 nt

```

1 agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aacaaccatt
51 ggatcaatct gtatggtaat tggatagtt agcttgatgt tacaattgg
101 gaacataatc tcaatatggg ttagtcattc aattcaaaca gggatcaac
151 accaggctga accatgcaat caaagcatta ttacttatga aaacaacacc
201 tgggtaaacc agacatatgt caacatcagc aataccaatt ttcttactga
251 gaaagctgtg gcttcagtaa cattagcggg caattcatct ctttgcccca
301 ttagtggatg ggctgtatac agtaaggaca acggtataag aatcggttcc
351 aagggggatg tgtttgttat aagagagccg ttcattcat gctcccactt
401 ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc
451 attctaattg gaccgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaattgagt
501 tgtcccgtgg gtgaggetcc ttcccatac aactcgaggt ttgagtctgt
551 tgcttggtcg gcaagtgett gtcattgatg cactagttgg ttgacaattg
601 gaatttctgg cccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc
651 ataataacag acactatcaa gagttggagg aacaacataa tgagaactca
701 agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact gttatgactg
751 atggaccaag taatgggcag gttcataca aaatcttcag aatagaaaaa
801 gggaaagtag ttaaattcagc cgaattaaat gcccctaatt atcactatga
851 ggagtgtctc tgttatcctg atgctggaga aatcacatgt gtgtgcaggg
901 ataactggca tggctcaaat cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg
951 gagtatcgaa taggatatat atgcagtggg gttttcggag acaatccacg
1001 cccaatgat gggacaggca gttgtggtcc ggtgtcccct aaaggggcat
1051 atggaataaa agggttctca tttaatacag gcaatggtgt ttggatcggg
1101 agaaccataa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc
1151 aatggatgg actggtacgg acagtaattt ttcagtaaag caagatatgt
1201 tagctataac cgattggtca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca
1251 gaactgacag gattagattg cataagacct tgtttctggg ttgagctaat
1301 cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg agcagcatat
1351 ccttttgtgg tgtaaattag gacactgtgg gttggtcttg gccagacggg
1401 gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa aaactccttg
1451 tttctact

```

5 Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/213/03 N1 (SEQ ID No: 14) Longitud de la molécula completa: 469 aa

```

1 mnpnqkitti gsicmvigiv slmlqignii siwvshsiqt gnqhqaepcn
51 qsiityennt wvnqtyvnis ntnfltekav asvtlagness lcpisgwavy
101 skdngirigs kgdvvfirep fiscshlecr tffltqgall ndkhsngtvk
151 drsphrtlms cpvgeapsy nsrfesvaws asachdgtsw ltigisgpdn
201 gavavlkyng iitdtikswr nnimrtqese cacvngscft vmtdgpsngq
251 asykifriek gkvvksaeln apnyhyeecs cypdageitc vcrdnwhgsn
301 rpwvsfnql eyrigyicsg vfgdnprpnd gtgscgpvsp kgaygikgfs
351 fkyngvwig rtkstnsrsg femiwdpngw tgtdsnfsvk qdivaitdws
401 gysgsfvqhp eltgldcirp cfwvelirgr pkestiwtsq ssisfcgvns
451 dtvgwswpdg aelpftidk

```

A/Hong Kong/491/97 (HA) + A/Hong Kong/486/97 (NA)

5 Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/491/97 H5 (SEQ ID No: 5) Longitud de la molécula completa: 1767 nt

```

1 agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc
51 ttgcaacagt cagccttggt aaaagtgacc agatttgcatt tggttaccat
101 gcaaacact cgacagagca agttgacaca ataattgaaa agaattgtac
151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaaag gacacacaac gggagctct
201 gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg tagttagct
251 ggatggctcc tcggaaaccc tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga
301 atggtctctac atagtggaga aggccagtcc agccaatgac ctctgttatc
351 cagggaattt caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata
401 aaccattttg agaaaattca gataatcccc aaaagtctct ggtccaatca
451 tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg tccatacctt gggaggtcct
501 cctttttcag aatgtggta tggcttatca aaaagaacag tagctaccca
551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttgggtact
601 gtgggggatt caccatecta atgatgcggc agagcagaca aggctctatc
651 aaaacccaac cacctacatt tccgttgaa catcaacact gaaccagaga
701 ttggttccag aatagctac tagacccaaa gtaaacgggc aaagtggaag
751 aatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc gaatgatgcc atcaatttcg
801 agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag
851 aaaggggact caacaattat gaaaagtga tgggaatatg gtaactgcaa
901 caccaagtgt caaactcaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc
951 acaacataca cccctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca
1001 aacagattag tccttgcaac tggactcaga aatacccctc aacgagagac
1051 gcgaggacta ttggagcta tagcaggtt tatagagga ggatggcagg
1101 gaatgtaga tggttggtat gggtagacc atagcaatga gcaggggagt
1151 ggatacgctg cagaccaaga atccacaca aaggcaatag atggagtcc
1201 caataaggtc aactcgatca ttaacaaaat gaacactcag tttgaggccg
1251 ttggaaggga atttaataac ttggaaggga ggatagagaa ttttaacaag
1301 aaaatggaag acggattcct agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct
1351 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaatgtca
1401 agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa tgcaaaggag
1451 ctgggtaatg gttgtttcga attctatcac aatgtgata acgaatgtat
1501 ggaaagtgtg aaaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag
1551 caagactaaa cagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatggga
1601 acttaccaaa tactgtcaat ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact

1651 ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg gatgtgctcc aatggatcgt
1701 tacaatgcag aatttgcatt taaatttggt agttcagatt gtagttaaaa
1751 acacccttgt ttctact

```

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/491/97 H5 (SEQ ID No: 15) Longitud de la molécula completa: 564 aa

ES 2 394 033 T3

```

1 mekiivlllat vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
51 rthngklcdl ngvklplird csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekas
101 pandlcypgn fndyeelkhl lsrinhfeki qiipksswsn hdassgvssa
151 cpylgrssff rnvvlikkn ssyptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
201 aeqtrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvseia trpkvngqsg rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsti mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrntpqr trglfgaiag
351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eqsgyaadq estqkaidgv tnkvnsiink
401 mntqfeavgr efnnerrie nlnkkmedgf ldvwtynael lvlmenertl
451 dfhdsvknk ydkvrlqlrd nakelngngcf efyhkcdnec mesvknngtyd
501 ypyyseearl nreeisgvkl esmgtyqils iystvassla laimvaglsl
551 wmcnsgslqc rici

```

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/486/97 H5 (SEQ ID No: 6) Longitud de la molécula completa: 1401 nt

```

1 agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt
51 ggatcaatct gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt tacaattgg
101 aaacacaata tcagtatggg tcagccacat aattaaact tggcacccaa
151 accagcctga accatgcaac caaagcatca atttttacac tgagcaggct
201 gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc ctattagtgg
251 atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggt tccaaagggg
301 atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc
351 agaacctttt tcttgacca aggagcccta ttgaatgaca agcattctaa
401 tgggaccgtc aaagacagga gccctatag aactttaatg agctgtcctg
451 ttggtgagge cccttcccca tacaactcaa ggtttgagtc tgttgcctgg
501 tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacia ttggaatttc
551 cgggccgat aatggggctg tggctgtgtt gaaatacaat ggcataataa
601 cagacaccat caagagttgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct
651 gaatgtgcat gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc
701 gagtaatgaa caggcctcat acaagatttt caagatagaa aaggggaggg
751 tagtcaaate agttgagttg aacgccccta attatcatta cgaggaatgc
801 tcctgttatc ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca gggataattg
851 gcatggctcg aaccgaccat ggggtgtctt caatcagaat ctggagtatc
901 aataggata tatatgcagt ggggttttcg gagacagtcc acgcccctaat
951 gatgggacag gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt
1001 aaaagggttt tcattttaa acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca
1051 aaagcactag ttccaggagc ggttttgaaa tgatttggga tccaaatggg
1101 tggaccgaaa cagacagtag cttctcgttg aagcaagaca tcatagcgat
1151 aactgattgg tcaggataca gcgggagttt tattcaacat ccagaactga
1201 caggattaaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaact aatcagaggg
1251 aggcccaaa agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg
1301 tgggtgtaaat agtgacactg tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt

1351 tgccatacac cattgaçaag tagtttgttc aaaaaactcc ttgtttctac
1401 t

```

5

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID No: 16) Longitud de la molécula completa: 450 aa

```

1 mnpnqiiti gsicmvgii slmlqignti svwvshiikt whpnqpepcn
51 qsinfyteqa aasvtlagns slcpisgwai yskdnsirig skgdvfvire
101 pfiscshlec rtffltqgal lndkhsngtv kdrspyrilm scpvgeapsp
151 ynsrfesvaw sasachdgis wltigisgpd ngavavlkyn giitdtiksw
201 rnntlrtqes ecacvngscf tvmtdgsne qasykifkie kgrvkvsvl
251 napnyhyeec scypdageit cvcrdnwhgs nrpwwsfqn leyqigyics
301 gvfgdsprpn dgtgscgpvs lngaygvkgf sfkyngvwi grtkstssrs
351 gfemiwdpng wtetdssfsl kqdiiaitdw sgysgsfiqh peltglncmr
401 pcfwvelirg rpkektiws gssisfcgvn sdtvgwswpd gaelpydidk

```

**A/Hong Kong/491/97 (Ser211) (HA) + A/Hong Kong/486/97 (NA)**

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/491/97 (Ser211) H5 (SEQ ID No: 7) Longitud de la molécula completa: 1767 nt

```

1 agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc
51 ttgcaacagt cagccttggt aaaagtgacc agatttgcac tggttaccat
101 gcaacaact cgacagagca agttgacaca ataatggaaa agaatgttac
151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaaag gacacacaac gggagactct
201 gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg tagtgtagct
251 ggatggctcc tcggaaccct tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga
301 atggtcttac atagtggaga aggccagtcc agccaatgac ctctgttata
351 caggggaattt caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata
401 aaccattttg agaaaattca gataatcccc aaaagttctt ggtccaatca
451 tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg tccatacctt gggaggtcct
501 cctttttcag aaatgtggtg tggcttatca aaaagaacag tagctacca
551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttgggtact
601 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggtctctatc
651 aaaacccaac cacctacatt tccgttgga catcaacact gaaccagaga
701 ttggtttcag aaatagctac tagaccctaa gtaaacgggc aaagtggaag
751 aatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc gaatgatgcc atcaatttcg
801 agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag
851 aaaggggact caacaattat gaaaagtga tgggaatatg gtaactgcaa
901 caccaagtgt caaactccaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc
951 acaacataca cccctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca
1001 aacagattag tccttgcaac tggactcaga aataccctc aacgagagac
1051 gcgaggacta tttggagcta tagcaggttt tatagagggg ggatggcagg
1101 gaatggtaga tggttggtat ggggtaccacc atagcaatga gcaggggagt
1151 ggatacgctg cagaccaaga atccacacaa aaggcaatag atggagtcac
1201 caataaggtc aactcgatca ttaacaaaat gaacactcag tttgaggccg
1251 ttggaaggga atttaataac ttggaaagga ggatagagaa tttaaacaag
1301 aaaatggaag acggattcct agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct

1351 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaagtca
1401 agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa tgcaaaggag
1451 ctgggtaatg gttgtttoga attctatcac aaatgtgata acgaatgtat
1501 ggaaagtgta aaaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag
1551 caagactaaa cagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatggga
1601 acttaccaaa tactgtcaat ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact
1651 ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg gatgtgctcc aatggatcgt
1701 tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt gtagttaaaa
1751 acacccttgt ttctact

```

5 Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/491/97 (Ser211) H5 (SEQ ID No: 17) Longitud de la molécula completa: 564 aa

```

1 mekiVlllat vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
51 rthngklcdl ngvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekas
101 pandlcyppn fndyeelkhl lsrinhfeki qiipksswsn hdassgvssa
151 cpylgrssff rnvwlikkn ssyptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
201 aeqtrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvseia trpkvngqsg rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsti mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrntpqre trglfgaiag
351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eqgsgyaadq estqkaidgv tnkvnsiink
401 mntqfeavgr efnnerrie nlnkkmedgf ldvwtyna el lvmenertl
451 dfhdsnvknl ydkvrlqlrd nakelngcf efyhkcdnec mesvkngtyd
501 ypqyseearl nreeisgvkl esmgyqils iystvassla laimvagls l
551 wmcnsngslqc rici

```

ES 2 394 033 T3

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID No: 8) Longitud de la molécula completa: 1401 nt

```

1 agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt
51 ggatcaatct gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt tacaaattgg
101 aacacacaata tcagtatggg tcagccacat aattaaact tggcacccaa
151 accagcctga accatgcaac caaagcatca atttttacac tgagcaggct
201 gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc ctattagtgg
251 atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggt tccaaagggg
301 atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc
351 agaacctttt tcttgaccca aggagcccta ttgaatgaca agcattctaa
401 tgggaccgtc aaagacagga gccctatag aactttaatg agctgtcctg
451 ttggtgaggc cccttcccca tacaactcaa ggtttgagtc tgttgcttgg
501 tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacaa ttggaatttc
551 cggtcgggat aatggggctg tggctgtgtt gaaatacaat ggcataataa
601 cagacacat caagagttgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct
651 gaatgtgcat gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc
701 gagtaatgaa caggcctcat acaagatttt caagatagaa aaggggaggg
751 tagtcaaatc agttgagttg aacgccccta attatcatta cgaggaatgc
801 tcctgttatc ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca gggataattg
851 gcatggctcg aaccgaccat ggggtgtctt caatcagaat ctggagtatc
901 aataggata tatatgcagt ggggttttcg gagacagtcc acgcccctaa
951 gatgggacag gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt
1001 aaaagggttt tcatttaaat acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca

1051 aaagcactag ttccaggagc ggttttgaaa tgatttggga tccaaatggg
1101 tggaccgaaa cagacagtag cttctcgttg aagcaagaca tcatagcgat
1151 aactgattgg tcaggataca gcgggagttt tattcaacat ccagaactga
1201 caggattaaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaact aatcagaggg
1251 aggcccaaaag agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg
1301 tgggtgtaaat agtgacactg tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt
1351 tgccatacac cattgacaag tagtttgttc aaaaaactcc ttgtttctac
1401 t

```

5 Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID No: 18) Longitud de la molécula completa: 450 aa

```

1 mnpnqkiiti gsicmvvgii slmlqignti svvwshiikt whpnqpepcn
51 qsinfyteqa aasvtaglans slcpisgwai yskdnsirig skgdvfvire
101 pfiscshlec rtffltqgal lndkhsngtv kdrspyrilm scpvgeapsp
151 ynsrfesvaw sasachdgis wltigisgpd ngavavlkyn giitdtiksw
201 rnntlrtqes ecacvngscf tvmtdgpsne qasykifkie kgrvvksvel
251 napnyhyeec scypdageit cvcrdnwhgs nrpwsfnqn leyqigyics
301 gvfgdsprpn dgtgscgpvs lngaygvkgf sfkyngvwi grtkstssrs
351 gfemiwdpng wtetdssfsl kqdiiaitdw sgysgsfiqh peltglncmr
401 pcfwvelirg rpkektiwtg gssisfcgvn sdtvgwswpd gaelpytidk

```

ca A/ck/Hong Kong/G9/97

10

Secuencia de nucleótidos de ca A/ck/Hong Kong/G9/97 (SEQ ID No: 9) Longitud de la molécula completa: 1690 pb

ES 2 394 033 T3

```

1 ttaaccactc aagatggaag caataccact aataactata ctactagtag
51 taacagcaag caatgcagac aaaatctgca tcggctacca atcaacaaac
101 tccacagaaa ccgtagacac gctaacagaa aacaatgttc ctgtgacaca
151 tgccaaagaa ttgctccaca cagagcacia tgggatgctg tgtgcaacaa
201 atctgggacg tcctcttatt ctagacactt gcaccattga aggactgatc
251 tatggcaacc cttcttgtga tctactgttg ggaggaagag aatggtccta
301 catcgtecaa agaccatcgg ctgttaatgg aatgtgttac cccgggaatg
351 tagaaaacct agaggaacta aggtcatttt ttagttctgc tagttcctac
401 caaagaatcc agatctttcc agacacaatc tggaatgtgt cttacagtgg
451 aacaagcaaa gcatgttcag attcattcta caggagcatg agatgggtga
501 ctcaaaagaa caacgcttac cctattcaag acgccaata cacaaataat
551 agaggaaaga gcattctttt catgtggggc ataatcacc cacctaccga
601 tactgcacag acaaatctgt acacaaggac tgacacaaca acaagtgtgg
651 caacagaaga tataaatagg accttcaaac cagtgatagg gccaaaggcc
701 cttgtcaatg gtctgcaggg aagaattgat tattattggt cggattgaa
751 accaggtcag acattgcgag taagatccaa tgggaatcta atcgctccat
801 ggtatgggca cattctttca ggagagagcc acggaagaat cctgaagact
851 gatttaaaca gtggtagctg tgtagtcaa tgtcaaacag aaagagggtg
901 cttaaatact actttgccat tccacaatgt cagtaaata gcattggaa
951 actgcccana atatgttggg gtaaagagtc tcaaactggc agttggctg
1001 agaatgtgc ctgctagatc aagtagagga ctatttgggg ccatagctgg
1051 attcatagag ggagggtggg cagggtcggg cgctggttgg tatgggttc
1101 agcattcaaa tgatcaaggg gttggtatag ctgcagatag agactcaact

1151 caaagggcaa ttgacaaaat aacgtccaaa gtgaataata tagtcgataa
1201 aatgaacaag caatatgaaa ttattgatca tgaattcagc gaggttgaaa
1251 atagactcaa tatgatcaat aataagattg atgaccagat acaagacata
1301 tgggcatata acgctgaatt gctagtctg cttgaaaacc agaaaacact
1351 cgatgagcat gatgcgaatg taaacaatct atataacaaa gtgaagaggg
1401 cactgggttc caatgcaatg gaagatggga aaggatgttt cgagctatac
1451 cataaatgtg atgatcagt catggagaca attcggaacg ggacctataa
1501 caggaggaag tataaagagg aatcaagact agaaagacag aaaatagaag
1551 gggtaagct ggaatctgaa ggaacttaca aaatcctcac catttattcg
1601 actgtcgcct catctcttgt gattgcaatg gggtttctg ccttcttgtt
1651 ctgggcatg tccaatggat cttgcagatg caacatttga

```

Secuencia de aminoácidos de ca A/ck/Hong Kong/G9/97 H9 (SEQ ID No: 19) Longitud de la molécula completa: 558 aa

```

1 meaiplitil lvvtasnadk icigyqstns tetvdtlten nvpvthakel
51 lhtehngmlc atnlgrplil dtctiegliy gnpscdlllg grewsyiver
101 psavngmcp gnvenleelr sffssassyq riqifpdtiw nvsygsksa
151 csdsfyrsmr wltqknnayp iqdaqytnnr gksilfmwgi nhpptdtaqt
201 nlytrtdttt svatedinrt fkpvigprpl vnglqgridy yswvlkpgqt
251 lrvrsngnli apwyghilsg eshgrilktd lnsqscvvc qtergglnnt
301 lpfhvnkyia fgncpkyvgv kslklavglr nvparssrgl fgaiagfieg
351 gwsglvagwy gfhqsndqgv giaadrstq raidkitskv nnivdkmnkq
401 yeiidhefse venrlmynn kiddiqdiw aynaellvll enqktldehd
451 anvnnlynkv kralgsname dgkgcfelyh kcddqcmeti rngtynrrky
501 keesrlerqk iegvkleseg tykiltiyst vasslviamg faaflwams
551 ngscrcni

```

5 Secuencia de nucleótidos de ca A/ck/Hong Kong/G9/97 N2 (SEQ ID No: 10) Longitud de la molécula completa: 1428 pb

ES 2 394 033 T3

1 aaatgaatcc aaatcagaag ataatagcaa ttggctctgt ttctctaact  
 51 attgcgacaa tatgcctcct catgcagatt gctatccttag caacgactat  
 101 gacactacat ttcaagcaga atgaatgcat caactcctcg aataatcaag  
 151 tagtgccatg tgaaccaatc ataatagaaa ggaacataac agagatagtg  
 201 catttgaata gtactacctt agagaaggaa atttgtccta aagtagcaga  
 251 ctacaggaat tggcctaaaac cacaatgtca aatcacaggg ttcgctcctt  
 301 tctccaagga caattcaatt aggctctccg cagggtggaga tatttgggtg  
 351 acaagagaac cttatgtatc gtgcgggtctt ggtaaatgtt atcaatttgc  
 401 acttgggcag ggaaccactt tggagaacaa aactcaaac ggacagcac  
 451 atgatagaac tcctcataga acccttttaa tgaatgagtt ggggtgtccg  
 501 tttcatttgg caaccaaca agtgtgcata gcatggcca gctcaagctg  
 551 ccatgatggg aaagcatggg tacatgtttg tgcactggg gatgatagaa  
 601 atgcaacggc tagcatcatt tatgatggga tacttgttga cagtattggg  
 651 tcatgggtcta aaaacatcct cagaactcag gagtcagaat gcgtttgcat  
 701 caatggaacc tgtgcagtag taatgactga tggaaagtga tcaggaaggg  
 751 ctgacactag aatactatctt attagagagg ggaaaattgc acacattagc  
 801 ccattgtcag gaagtgtcga gcatgtggag gaatgtcctt gttacccccg  
 851 atatccagaa gttagatgtg tttgcagaga caattggaag ggatccaata  
 901 ggccccgttct atatataaat atggcaaat atagtattga ttccagttat

951 gtgtgctcag gacttgttgg cgacacacca agaaatgatg ataggtctag  
 1001 cagcagcaac tgcagagatc ctaataacga gagaggggcc ccaggagtaa  
 1051 aaggggtgggc ctttgacaat ggaaatgaca tttggatggg aagaacaatc  
 1101 aaaaaggatt cgcgctcagg ttatgagact ttcaggggtca ttgggtgggtg  
 1151 gaccactgct aattccaagt cacagataaa tagacaagtc atagttgaca  
 1201 gtgataactc gtctgggtat tctgggtatct tctctgttga aggcaaaagc  
 1251 tgcatacaaca ggtgttttta cgtggagttg ataagaggaa gaccaaagga  
 1301 gactaggggtg tgggtggactt caaatagcat cattgtattt tgtggaactt  
 1351 caggtacctt tggaaacaggc tcatggcctg atggggcgaa tatcaatttc  
 1401 atgcctatat aagctttcgc aatttttag

Secuencia de aminoácidos de ca A/ck/Hong Kong/G9/97 N2 (SEQ ID No: 20) Longitud de la molécula completa: 469 aa

1 mnpnqkii ai gsvsltiati cllmqiaila tmtlhfkn ecinssnnqv  
 51 vpcepiier niteivhl ns ttlekeicpk vadyrnwskp qcqitgfapf  
 101 skdnsirlsa ggdiwvrep yvscglgkcy qfalgggttl enkhsngtah  
 151 drtphrllm nelgvpfhla tkqvciawss sschdgkawl hvcvtgddrn  
 201 atasiiydgi lvdsigswsk nilrtqesec vcingtcavv mtdgsasgra  
 251 dtrilfireg kiahisplsg saqhveesc yprypevrcv crdnwkgsnr  
 301 pvlyinmany sidssyvcs g lvgdtpnrdd rssssncrdp nnergapgvk  
 351 gwafdngndi wmgrtikks rsgyetfrvi ggwtansks qinrqvivid  
 401 dnssgysgif svegkscinr cfyvelirgr pketrvwvts nsiivfcgts  
 451 gtygtgswpd ganinfmpi

Sumario de las designaciones de los No de SEQ ID

SEQ ID No	HA o NA	NOMBRE DE LA CEPA	Aminoácido o nucleótido
SEQ ID No: 1	HA (H5)	ca A/Vietnam/1203/04	Nucleótido
SEQ ID No: 2	NA (N1)	ca A/Vietnam/1203/04	Nucleótido
SEQ ID No: 3	HA (H5)	ca A/Hong Kong/213/03	Nucleótido
SEQ ID No: 4	NA (N1)	ca A/Hong Kong/213/03	Nucleótido
SEQ ID No: 5	HA (H5)	ca A/Hong Kong/491/97	Nucleótido
SEQ ID No: 6	NA (N1)	ca A/Hong Kong/486/97	Nucleótido
SEQ ID No: 7	HA (H5)	ca A/Hong Kong/491/97 (Ser211)	Nucleótido
SEQ ID No: 8	NA (N1)	ca A/Hong Kong/486/97	Nucleótido
SEQ ID No: 9	HA (H9)	ca A/ck/Hong Kong/G9/97	Nucleótido
SEQ ID No: 10	NA (N2)	ca A/ck/Hong Kong/G9/97	Nucleótido
SEQ ID No: 11	HA (H5)	ca A/Vietnam/1203/04	Aminoácido
SEQ ID No: 12	NA (N1)	ca A/Vietnam/1203/04	Aminoácido
SEQ ID No: 13	HA (H5)	ca A/Hong Kong/213/03	Aminoácido
SEQ ID No: 14	NA (N1)	ca A/Hong Kong/213/03	Aminoácido
SEQ ID No: 15	HA (H5)	ca A/Hong Kong/491/97	Aminoácido
SEQ ID No: 16	NA (N1)	ca A/Hong Kong/486/97	Aminoácido
SEQ ID No: 17	HA (H5)	ca A/Hong Kong/491/97 (Ser211)	Aminoácido
SEQ ID No: 18	NA (N1)	ca A/Hong Kong/486/97	Aminoácido
SEQ ID No: 19	HA (H9)	ca A/ck/Hong Kong/G9/97	Aminoácido
SEQ ID No: 20	NA (N2)	ca A/ck/Hong Kong/G9/97	Aminoácido

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MedImmune Vaccines, Inc et al.

<120> VARIANTES DE HEMAGLUTININA Y NEURAMINIDASA DE INFLUENZA

5

<130> FL260

<150> 60/574.553

<151> 25-05-2004

10

<150> 60/657.554

<151> 28-02-2005

<160> 20

15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1767

20

<212> ADN

<213> Virus influenza

<400> 1

agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt ttgcaatagt	60
cagtcttggt aaaagtgatc agatttgcat tggttaccat gcaacaact cgacagagca	120
ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa	180
gaaacacaac gggagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg	240
tagcgtagct ggatggctcc tcggaaacc aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga	300
atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agtcaatgac ctctgttacc caggggattt	360
caatgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca	420
gatcatcccc aaaagttctt ggtccagtca tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg	480
tccataccag gaaagtcct cctttttcag aaatgtggtt tggcttatca aaaagaacag	540
tacataccca acaataaaga ggagctaca taataccaac caagaagatc ttttggact	600
gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aagctctatc aaaacccaac	660
cacctatatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa gaatagctac	720
tagatccaaa gtaaacgggc aaagtggaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc	780
gaatgatgca atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa	840
aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtga tgggaatatg gtaactgcaa	900
caccaagtgt caaactccaa tggggcgat aaactctagc atgccattcc acaatataca	960
ccctctcacc attggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcgac	1020
tgggctcaga aatagccctc aaagagagac tcgaggatta tttggagcta tagcaggttt	1080
tatagagggg ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggtagacc atagcaatga	1140
gcaggggagt gggtagctg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac	1200
caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaagggg	1260
atttaacaac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag aagatggaag acgggttcct	1320
agatgtetgg acttataatg ctgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga	1380
ctttcatgac tcaaatgtca agaaccitta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa	1440
tgcaaaggag ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcat aaatgtgata atgaatgtat	1500
ggaaagtgta agaaatggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag cgagactaaa	1560
aagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatagga atttaccaaa tactgtcaat	1620
ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatccttatg	1680
gatgtgctcc aatgggtcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt	1740
gtagttaaaa acacccttgt ttctact	1767

<210> 2  
 <211> 1398  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza  
 <400> 2

5

agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatc gggccaatct 60  
 gtatggtaac tggaatagtt agcttaatgt tacaaattgg gaacatgac tcaatatggg 120  
 tcagtcattc aattcacaca gggaaatcaac accaatctga accaatcagc aataactaatt 180  
 ttcttactga gaaagctgtg gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca 240  
 ttaacggatg ggctgtatac agtaaggaca acagtataag gatcgggtcc aagggggatg 300  
 tgtttgttat aagagagccg ttcattctcat gctccccactt ggaatgcaga actttctttt 360  
 tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc 420  
 ctcacagaac attaatgagt tgcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt 480  
 ttgagtctgt tgcttggtca gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttgacgattg 540  
 gaatttctgg cccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag 600  
 acactatcaa gagttggagg aacaacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg 660  
 taaatggctc ttgctttact gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata 720  
 agatcttcaa aatggaaaaa gggaaagtgg ttaaatacagt cgaattggat gctcctaatt 780  
 atcactatga ggaatgctcc tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg 840  
 ataattggca tggctcaaat cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa 900  
 taggatatat atgcagtggg gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggtg 960  
 gttgtgggtc ggtgtcctct aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatagc 1020  
 gcaatgggtg ctggatcggg agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga 1080  
 tttgggatcc aatgggtgg actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg 1140  
 tagcaataac tgattgggtca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag 1200  
 gactagattg cataagacct tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga 1260  
 gcacaatttg gactagtggg agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg 1320  
 gttggtcttg gccagacggt gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa 1380  
 aaactccttg tttctact 1398

<210> 3  
 <211> 1767  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 3

agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt ttgcaatagt 60  
 cagtcttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat gcaacaact cgacagagca 120  
 ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa 180  
 gacacacaac gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg 240  
 tagtgtagct ggatggctcc tcggaaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga 300  
 atggctcttac atagtggaga aggccaatcc agccaatgac ctctgttacc caggggattt 360  
 caacgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca 420  
 gatcatcccc aaaaattctt ggtccagtca tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg 480  
 tccataccaa ggaaagtcct cctttttcag gaatgtggtg tggcttatca aaaagaacaa 540  
 tgcataccca acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttgggtatt 600  
 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagact aggctctatc aaaacccaac 660  
 cacctacatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaaa aatagctac 720  
 tagatccaaa gtaaacgggc aaaatggaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc 780  
 gaatgatgca atcaacttcg agagcaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa 840  
 aattgtcaag aaaggggact cagcaattat gaaaagtga tttggaatatg gtaactgcaa 900  
 caccaagtgt caaactccaa tgggggagat aaactctagt atgccattcc acaatataca 960  
 ccctctcacc atcgggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcgac 1020  
 tgggctcaga aatagccctc aaagagagac tcgaggatta tttggagcta tagcaggttt 1080  
 tatagagga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggaccacc atagcaatga 1140  
 gcaggggagt gggtagctg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac 1200  
 caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaagga 1260  
 atttaataac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag aagatggaag acggattcct 1320  
 agatgtctgg acttataatg ctgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga 1380  
 ctttcatgac tcaaagtca agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa 1440  
 tgcaaaggag ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcac aaatgtgata atgaatgcat 1500  
 ggaaagtgta agaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag caagactaaa 1560  
 aagagaggaa ataagtggag taaaattgga gtcaatagga acttaccaaa tactgtcaat 1620  
 ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg 1680  
 gatgtgctcc aatgggtcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt 1740  
 gtagttaaaa acacccttgt ttctact 1767

<210> 4  
 <211> 1458  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 4

agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aacaaccatt ggatcaatct 60  
 gtatggtaat tggaatagtt agcttgatgt tacaaattgg gaacataatc tcaatatggg 120  
 ttagtcattc aattcaaaca gggaaatcaac accaggctga accatgcaat caaagcatta 180  
 ttacttatga aaacaacacc tgggtaaacc agacatatgt caacatcagc aataccaatt 240  
 ttcttactga gaaagctgtg gcttcagtaa cattagcggg caattcatct ctttgcccca 300  
 ttagtggatg ggctgtatac agtaaggaca acgggtataag aatcggttcc aagggggatg 360  
 tgtttgttat aagagagccg ttcattctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt 420  
 tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc attctaattg gaccgtcaaa gacagaagcc 480  
 ctcacagaac attaatgagt tgtcccgtgg gtgaggetcc ttcccatac aactcgaggt 540  
 ttgagtctgt tgcttggtcg gcaagtgctt gtcattgatg cactagttgg ttgacaattg 600  
 gaatttctgg cccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag 660  
 acaactatca gagttggagg aacaacataa tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg 720  
 taaatggctc ttgctttact gttatgactg atggaccaag taatgggcag gcttcataca 780  
 aaatcttcag aatagaaaaa gggaaagtag ttaaatacag cgaattaaat gcccctaatt 840  
 atcactatga ggagtgtcc tgttatcctg atgctggaga aatcacatgt gtgtgcaggg 900  
 ataactggca tggctcaaat cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcgaa 960  
 taggatatat atgcagtgga gttttcggag acaatccag cccaatgat gggacaggca 1020  
 gttgtggtcc ggtgtcccct aaaggggcat atggaataaa agggttctca tttaaatag 1080  
 gcaatggtgt ttggatcggg agaaccaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga 1140  
 tttgggatcc aatggatgg actggtacgg acagtaattt ttcagtaaag caagatattg 1200  
 tagctataac cgattggtca ggatatagcg ggagtttgt ccagcatcca gaactgacag 1260  
 gattagattg cataagacct tgtttctggg ttgagctaat cagagggcgg cccaaagaga 1320  
 gcacaatttg gactagtggg agcagcatat ccttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg 1380  
 gttggtcttg gccagacggt gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa 1440  
 aaactccttg tttctact 1458

<210> 5  
 <211> 1767  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 5

agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaacagt 60  
 cagccttggt aaaagtgacc agatttgcatt tggttaccat gcaacaact cgacagagca 120  
 agttgacaca ataatggaaa agaatgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaag 180

gacacacaac ggggaagctct gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg 240  
tagtgtagct ggatggctcc tcggaaaccc tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga 300  
atggtcttac atagtggaga aggccagtcc agccaatgac ctctgttatc cagggattt 360  
caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca 420  
gataatcccc aaaagttctt ggtccaatca tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg 480  
tccatacctt gggaggtcct cctttttcag aaatgtggtg tggcttatca aaaagaacag 540  
tagctaccca acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggact 600  
gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggctctatc aaaaccaac 660  
cacctacatt tccgttgga catcaacact gaaccagaga ttggttccag aaatagctac 720  
tagacccaaa gtaaaccggc aaagtggaag aatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc 780  
gaatgatgcc atcaatttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa 840  
aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa 900  
caccaagtgt caaactccaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc acaacataca 960  
ccccctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac 1020  
tgactcaga aatacccctc aacgagagac gcgaggacta tttggagcta tagcaggttt 1080  
tatagagga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggaccacc atagcaatga 1140  
gcaggggagt ggatacgtg cagaccaaga atccacacaa aaggcaatag atggagtcac 1200  
caataaggtc aactcgatca ttaacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaagga 1260  
atthaataac ttggaagga ggatagagaa tthaacaag aaaatggaag acggattcct 1320  
agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga 1380  
ctttcatgac tcaaatgtca agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttaggataa 1440  
tgcaaaggag ctgggtaatg gttgtttcga attctatcac aaatgtgata acgaatgtat 1500  
ggaaagtgt aaaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag caagactaaa 1560  
cagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatggga acttaccaaa tactgtcaat 1620  
ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg 1680  
gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt 1740  
gtagttaaaa acacccttgt ttctact 1767

<210> 6  
<211> 1401  
<212> ADN  
<213> Virus influenza

5

<400> 6

```

agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt ggatcaatct      60
gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt tacaaattgg aaacacaata tcagtatggg      120
tcagccacat aattaaact tggcacccaa accagcctga accatgcaac caaagcatca      180
atTTTTacac tgagcaggct gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc      240

ctattagtgg atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggg tccaaagggg      300
atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc agaaccTTTT      360
tcttgacca aggagcccta ttgaatgaca agcattctaa tgggaccgtc aaagacagga      420
gcccctatag aactttaatg agctgtcctg ttggtgaggc cccttcccca tacaactcaa      480
ggtttgagtc tgttgcttgg tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacaa      540
ttggaatttc cgggccggat aatggggctg tggctgtgtt gaaatacaat ggcataataa      600
cagacaccat caagagtgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct gaatgtgcat      660
gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc gagtaatgaa caggcctcat      720
acaagatttt caagatagaa aaggggaggg tagtcaaadc agttgagttg aacgccccta      780
attatcatta cgaggaatgc tctgtttatc ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca      840
gggataattg gcatggctcg aaccgaccat ggggtgtctt caatcagaat ctggagtatc      900
aaataggata tatatgcagt ggggttttcg gagacagtcc acgccccaat gatgggacag      960
gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt aaaagggttt tcatttaaat     1020
acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca aaagcactag ttccaggagc ggttttgaaa     1080
tgatttgggg tccaaatggg tggaccgaaa cagacagtag cttctcgttg aagcaagaca     1140
tcatagcgat aactgattgg tcaggataca gcgggagttt tattcaacat ccagaactga     1200
caggattaaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaaact aatcagaggg aggcccaaag     1260
agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg tgggtgtaaat agtgacactg     1320
tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt tgccatacac cattgacaag tagtttgttc     1380
aaaaaactcc ttgtttctac t                                             1401

```

<210> 7  
 <211> 1767  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 7

agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaacagt 60  
 cagccttggt aaaagtgacc agatttgcac tggttaccat gcaaacaact cgacagagca 120  
 agttgacaca ataatggaaa agaattgtac tgttacacat gccaagaca tactggaaag 180  
 gacacacaac ggggaagctct gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg 240  
 tagttagct ggatggctcc tcggaaacce tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga 300  
 atggcttac atagtggaga aggccagtc agccaatgac ctctgttate caggggaattt 360  
 caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca 420  
 gataatcccc aaaagtctt ggtccaatca tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg 480  
 tccatacctt gggaggtcct ccttttcag aatgtggta tggcttatca aaaagaacag 540  
 tagctacca acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggact 600  
 gtgggggatt caccatecta atgatgcggc agagcagaca aggctctatc aaaaccaac 660  
  
 cactacatt tccgttgga catcaacact gaaccagaga ttggtttcag aaatagctac 720  
 tagacccaaa gtaaacgggc aaagtggaag aatggagtc ttctggacaa ttttaaagcc 780  
 gaatgatgcc atcaatttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa 840  
 aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa 900  
 caccaagtgt caaactccaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc acaacataca 960  
 cccctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac 1020  
 tggactcaga aatacccctc aacgagagac gcgaggacta tttggagcta tagcaggttt 1080  
 tatagagga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggtaccacc atagcaatga 1140  
 gcaggggagt ggatacgtg cagaccaaga atccacacaa aaggcaatag atggagtcac 1200  
 caataaggtc aactcgatca ttaacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaagga 1260  
 atttaataac ttggaagga ggatagagaa tttaaacaag aaaatggaag acggattcct 1320  
 agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga 1380  
 ctttcatgac tcaaatgtca agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa 1440  
 tgcaaaggag ctgggtaatg gttgtttcga attctatcac aaatgtgata acgaatgtat 1500  
 ggaaagtgt aaaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag caagactaaa 1560  
 cagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatggga acttaccaaa tactgtcaat 1620  
 ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg 1680  
 gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttggtg agttcagatt 1740  
 gtagttaaaa acacccttgt ttctact 1767

<210> 8  
 <211> 1401  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 8

agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt ggatcaatct 60  
 gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt tacaaattgg aaacacaata tcagtatggg 120  
 tcagccacat aattaaaact tggcacccaa accagcctga accatgcaac caagcatca 180  
 atttttacac tgagcaggct gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc 240  
 ctattagtgg atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggt tccaaagggg 300  
 atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc agaacctttt 360  
 tcttgaccca aggagcccta ttgaatgaca agcattctaa tgggaccgtc aaagacagga 420  
 gcccctatag aactttaatg agctgtcctg ttggtgaggc cccttcccca tacaactcaa 480  
 ggtttgagtc tgttgcttgg tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacaa 540  
 ttggaatttc cggtcgggat aatggggctg tggctgtggt gaaatacaat ggcataataa 600  
 cagacaccat caagagttgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct gaatgtgcat 660  
 gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc gagtaatgaa caggcctcat 720  
  
 acaagatttt caagatagaa aaggggaggg tagtcaaadc agttgagttg aacgccccta 780  
 attatcatta cgaggaatgc tcctgttatc ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca 840  
 gggataattg gcatggctcg aaccgacat ggggtgtctt caatcagaat ctggagtatc 900  
 aataggata tatatgcagt ggggttttctg gagacagtcc acgccccaat gatgggacag 960  
 gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt aaaagggttt tcatttaaat 1020  
 acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca aaagcactag ttccaggagc ggttttgaaa 1080  
 tgatttggga tccaaatggg tggaccgaaa cagacagttag cttctcgttg aagcaagaca 1140  
 tcatagcgat aactgattgg tcaggataca gcgggagttt tattcaacat ccagaactga 1200  
 caggattaaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaact aatcagaggg aggcccaaag 1260  
 agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg tgggtgaaat agtgacactg 1320  
 tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt tgccatacac cattgacaag tagtttgttc 1380  
 aaaaaactcc ttgtttctac t 1401

<210> 9  
 <211> 1690  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 9

ttaaccactc aagatggaag caataccact aataactata ctactagtag taacagcaag 60  
 caatgcagac aaaatctgca tcggctacca atcaacaaac tccacagaaa ccgtagacac 120  
 gctaacagaa aacaatgttc ctgtgacaca tgccaaagaa ttgctccaca cagagcacia 180  
 tgggatgctg tgtgcaacaa atctgggacg tcctcttatt ctagacactt gcaccattga 240  
 aggactgatc tatggcaacc cttcttgtga tctactgttg ggaggaagag aatggctcta 300  
 catcgtcgaa agaccatcgg ctgttaatgg aatgtgttac cccgggaatg tagaaaacct 360  
 agaggaacta aggtcatttt ttagttctgc tagttcctac caaagaatcc agatctttcc 420  
 agacacaatc tggaatgtgt cttacagtgg aacaagcaaa gcatgttcag attcattcta 480  
 caggagcatg agatgggtga ctcaaaagaa caacgcttac cctattcaag acgccaata 540  
 cacaataat agaggaaga gcattctttt catgtggggc ataaatcacc cacctaccga 600  
 tactgcacag acaaatctgt acacaaggac tgacacaaca acaagtgtgg caacagaaga 660  
 tataaatagg accttcaaac cagtgatagg gccaggccc cttgtcaatg gtctgcaggg 720  
 aagaattgat tattattggt cggtattgaa accaggtcag acattgcgag taagatccaa 780  
 tgggaatcta atcgtccat ggtatgggca cattctttca ggagagagcc acggaagaat 840  
 cctgaagact gatttaaaca gtggtagctg tgtagtgcaa tgtcaaacag aaagaggtgg 900  
 cttaaatact actttgccat tccacaatgt cagtaaatac gcatttgga actgccc aaa 960  
 atatgttgga gtaaagagtc tcaaactggc agttggtctg aggaatgtgc ctgctagatc 1020  
 aagtagagga ctatttgggg ccatagctgg atccatagag ggaggttggg cagggctggg 1080  
 cgctggttgg tatgggttcc agcattcaaa tgatcaaggg gttggtatag ctgcagatag 1140  
  
 agactcaact caaagggcaa ttgacaaaat aacgtccaaa gtgaataata tagtcgataa 1200  
 aatgaacaag caatatgaaa ttattgatca tgaattcagc gaggttgaaa atagactcaa 1260  
 tatgatcaat aataagattg atgaccagat acaagacata tgggcatata acgctgaatt 1320  
 gctagtgctg cttgaaaacc agaaaacact cgatgagcat gatgcgaatg taacaatct 1380  
 atataacaaa gtgaagaggg cactgggttc caatgcaatg gaagatggga aaggatgttt 1440  
 cgagctatac cataaatgtg atgatcagt9 catggagaca attcggaacg ggacctataa 1500  
 caggaggaag tataaagagg aatcaagact agaaagacag aaaatagaag gggatcaagct 1560  
 ggaatctgaa ggaacttaca aaatctcac catttattcg actgtgcct catctctgt 1620  
 gattgcaatg gggtttctg ccttcttgtt ctgggccatg tccaatggat cttgcagatg 1680  
 caacatttga 1690

<210> 10  
 <211> 1428  
 <212> ADN  
 <213> Virus influenza

5

<400> 10

```

aatgaatcc aatcagaag ataatagcaa ttggctctgt ttctctaact attgcgacaa      60
tatgcctcct catgcagatt gctatcttag caacgactat gacactacat ttcaagcaga      120
atgaatgcat caactcctcg aataatcaag tagtgccatg tgaaccaatc ataatagaaa      180
ggaacataac agagatagtg catttgaata gtactacctt agagaaggaa atttgtccta      240
aagtagcaga ctacaggaat tggcaaaac cacaatgtca aatcacaggg ttcgctcctt      300
tctccaagga caattcaatt aggctctccg caggtggaga tatttgggtg acaagagaac      360
cttatgtatc gtgCGGTctt ggtaaagtgt atcaatttgc acttgggcag ggaaccactt      420
tggagaacaa acactcaaac ggcacagcac atgatagaac tcctcataga acccttttaa      480
tgaatgagtt ggggtgtccg tttcatttgg caaccaaaca agtgtgcata gcatggtcca      540
gctcaagctg ccatgatggg aaagcatggt tacatgtttg tgtcactggg gatgatagaa      600
atgcaacggc tagcatcatt tatgatggga tacttgttga cagtattggt tcatggtcta      660
aaaacatcct cagaactcag gagtcagaat gcgtttgcac caatggaacc tgtgcagtag      720
taatgactga tggaaagtga tcaggaaggg ctgacactag aatactattt attagagagg      780
ggaaaattgc acacattagc ccattgtcag gaagtgtca gcatgtggag gaatgtcctt      840
gttaccctccg atatccagaa gttagatgtg ttgCagaga caattggaag ggatccaata      900
ggcccgttct atatataaat atggcaaatt atagtattga ttccagttat gtgtgctcag      960
gacttgttgg cgacacacca agaaatgatg ataggtctag cagcagcaac tgcagagatc     1020
ctaataacga gagagggggc ccaggagtaa aaggggtggc ctttgacaat ggaaatgaca     1080
tttgatggg aagaacaatc aaaaaggatt cgcgctcagg ttatgagact ttcaggggtca     1140
ttggtggttg gaccactgct aattccaagt cacagataaa tagacaagtc atagttgaca     1200
gtgataactc gtctgggtat tctggtatct tctctgttga aggcaaaagc tgcatcaaca     1260

gggtttttta cgtggagttg ataagaggaa gaccaaagga gactaggggtg tgggtggactt     1320
caaatagcat cattgtattt tgtggaactt caggtaccta tggaacaggc tcatggcctg     1380
atggggcgaa tatcaatttc atgcctatat aagctttcgc aattttag                       1428

```

<210> 11  
 <211> 564  
 <212> PRT  
 <213> Virus influenza  
  
 <400> 11

5

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

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn  
 245 250 255  
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 260 265 270  
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
 275 280 285  
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 290 295 300  
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser  
 325 330 335  
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
 340 345 350  
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
 355 360 365  
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
 370 375 380  
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
 385 390 395 400  
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
 405 410 415  
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
 420 425 430  
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
 435 440 445  
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
 450 455 460  
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe  
 465 470 475 480  
 Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
 485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg  
500 505 510

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile  
515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

- <210> 12
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> Virus influenza
- <400> 12

5

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val  
1 5 10 15

Thr Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile  
20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile His Thr Gly Asn Gln His Gln Ser Glu Pro  
35 40 45

Ile Ser Asn Thr Asn Phe Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser Val Lys  
50 55 60

Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Asn Gly Trp Ala Val Tyr  
65 70 75 80

Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe Val  
85 90 95

Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr Phe  
100 105 110

Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr  
115 120 125

Val Lys Asp Arg Ser Pro His Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val Gly  
130 135 140

Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser  
145 150 155 160

Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile Ser  
165 170 175

Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile  
 180 185 190  
 Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu  
 195 200 205  
 Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met Thr Asp  
 210 215 220  
 Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser His Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr  
 245 250 255  
 Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Ala Gly Glu Ile Thr Cys Val Cys  
 260 265 270  
 Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln  
 275 280 285  
 Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp  
 290 295 300  
 Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly Asn Gly  
 325 330 335  
 Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu  
 340 345 350  
 Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp Ser Ser Phe Ser  
 355 360 365  
 Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly  
 370 375 380  
 Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile Arg Pro  
 385 390 395 400  
 Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser Thr Ile  
 405 410 415  
 Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser Asp Thr  
 420 425 430  
 Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr Ile Asp  
 435 440 445

Lys

<210> 13  
 <211> 564  
 <212> PRT  
 <213> Virus influenza

5

<400> 13

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

225					230					235				240	
Arg	Met	Glu	Phe	Phe 245	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys 250	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile 255	Asn
Phe	Glu	Ser	Asn 260	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala 265	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr 270	Lys	Ile
Val	Lys	Lys 275	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile 280	Met	Lys	Ser	Glu	Leu 285	Glu	Tyr	Gly
Asn	Cys 290	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln 295	Thr	Pro	Met	Gly	Ala 300	Ile	Asn	Ser	Ser
Met 305	Pro	Phe	His	Asn	Ile 310	His	Pro	Leu	Thr	Ile 315	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys 320
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn 325	Arg	Leu	Val	Leu	Ala 330	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn 335	Ser
Pro	Gln	Arg	Glu 340	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe 345	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly 350	Phe	Ile
Glu	Gly	Gly 355	Trp	Gln	Gly	Met	Val 360	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly 365	Tyr	His	His
Ser	Asn 370	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly 375	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys 380	Glu	Ser	Thr	Gln
Lys 385	Ala	Ile	Asp	Gly	Val 390	Thr	Asn	Lys	Val	Asn 395	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys 400
Met	Asn	Thr	Gln	Phe 405	Glu	Ala	Val	Gly	Arg 410	Glu	Phe	Asn	Asn	Leu 415	Glu
Arg	Arg	Ile	Glu 420	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys 425	Met	Glu	Asp	Gly	Phe 430	Leu	Asp
Val	Trp	Thr 435	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu 440	Leu	Val	Leu	Met	Glu 445	Asn	Glu	Arg
Thr 450	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser 455	Asn	Val	Lys	Asn	Leu 460	Tyr	Asp	Lys	Val
Arg 465	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp 470	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu 475	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe 480
Glu	Phe	Tyr	His	Lys 485	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys 490	Met	Glu	Ser	Val	Arg 495	Asn
Gly	Thr	Tyr	Asp 500	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser 505	Glu	Glu	Ala	Arg	Leu 510	Lys	Arg

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile  
 515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

- <210> 14
- <211> 469
- 5 <212> PRT
- <213> Virus influenza

<400> 14

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Thr Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val  
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile  
 20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala Glu Pro  
 35 40 45

Cys Asn Gln Ser Ile Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln  
 50 55 60

Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Leu Thr Glu Lys Ala Val  
 65 70 75 80

Ala Ser Val Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly  
 85 90 95

Trp Ala Val Tyr Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly  
 100 105 110

Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu  
 115 120 125

Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His  
 130 135 140

Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro His Arg Thr Leu Met Ser  
 145 150 155 160

Cys Pro Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser  
 165 170 175

Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr  
 180 185 190  
 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr  
 195 200 205  
 Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Met  
 210 215 220  
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr  
 225 230 235 240  
 Val Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe  
 245 250 255  
 Arg Ile Glu Lys Gly Lys Val Val Lys Ser Ala Glu Leu Asn Ala Pro  
 260 265 270  
 Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile  
 275 280 285  
 Thr Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val  
 290 295 300  
 Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly  
 325 330 335  
 Pro Val Ser Pro Lys Gly Ala Tyr Gly Ile Lys Gly Phe Ser Phe Lys  
 340 345 350  
 Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg  
 355 360 365  
 Ser Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp  
 370 375 380  
 Ser Asn Phe Ser Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp  
 405 410 415  
 Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys  
 420 425 430  
 Glu Ser Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val  
 435 440 445  
 Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro

450

455

460

Phe Thr Ile Asp Lys  
465

<210> 15

<211> 564

<212> PRT

5 <213> Virus influenza

<400> 15

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Thr Val Ser Leu Val Lys Ser  
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val  
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
35 40 45

Leu Glu Arg Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asn Gly Val Lys  
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
85 90 95

Glu Lys Ala Ser Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn  
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu  
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ser Tyr Pro Thr Ile  
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp  
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln  
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
210 215 220

Leu Val Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn  
 245 250 255  
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 260 265 270  
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
 275 280 285  
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 290 295 300  
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Thr  
 325 330 335  
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
 340 345 350  
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
 355 360 365  
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Glu Ser Thr Gln  
 370 375 380  
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asn Lys  
 385 390 395 400  
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
 405 410 415  
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
 420 425 430  
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
 435 440 445  
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
 450 455 460  
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe  
 465 470 475 480  
 Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn  
 485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Asn Arg  
 500 505 510

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
 515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 16  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Virus influenza

5

<400> 16

10

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val  
 1 5 10 15

Val Gly Ile Ile Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Thr Ile Ser Val  
 20 25 30

Trp Val Ser His Ile Ile Lys Thr Trp His Pro Asn Gln Pro Glu Pro  
 35 40 45

Cys Asn Gln Ser Ile Asn Phe Tyr Thr Glu Gln Ala Ala Ala Ser Val  
 50 55 60

Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala Ile  
 65 70 75 80

Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe  
 85 90 95

Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr  
 100 105 110

Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly  
 115 120 125

Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val  
 130 135 140

Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp  
 145 150 155 160

Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile  
 165 170 175

Ser Gly Pro Asp 180 Asn Gly Ala Val Ala 185 Val Leu Lys Tyr Asn 190 Gly Ile

Ile Thr Asp 195 Thr Ile Lys Ser Trp 200 Arg Asn Asn Thr Leu 205 Arg Thr Gln

Glu Ser 210 Glu Cys Ala Cys Val 215 Asn Gly Ser Cys Phe 220 Thr Val Met Thr

Asp 225 Gly Pro Ser Asn 230 Glu Gln Ala Ser Tyr Lys 235 Ile Phe Lys Ile Glu 240

Lys Gly Arg Val Val 245 Lys Ser Val Glu Leu 250 Asn Ala Pro Asn Tyr 255 His

Tyr Glu Glu Cys 260 Ser Cys Tyr Pro Asp 265 Ala Gly Glu Ile Thr 270 Cys Val

Cys Arg Asp 275 Asn Trp His Gly Ser 280 Asn Arg Pro Trp Val 285 Ser Phe Asn

Gln Asn 290 Leu Glu Tyr Gln Ile 295 Gly Tyr Ile Cys Ser 300 Gly Val Phe Gly

Asp 305 Ser Pro Arg Pro Asn 310 Asp Gly Thr Gly Ser 315 Cys Gly Pro Val Ser 320

Leu Asn Gly Ala Tyr 325 Gly Val Lys Gly Phe 330 Ser Phe Lys Tyr Gly 335 Asn

Gly Val Trp Ile 340 Gly Arg Thr Lys Ser 345 Thr Ser Ser Arg Ser 350 Gly Phe

Glu Met Ile 355 Trp Asp Pro Asn 360 Gly Trp Thr Glu Thr Asp 365 Ser Ser Phe

Ser Leu 370 Lys Gln Asp Ile Ile 375 Ala Ile Thr Asp Trp 380 Ser Gly Tyr Ser

Gly 385 Ser Phe Ile Gln His 390 Pro Glu Leu Thr Gly 395 Leu Asn Cys Met Arg 400

Pro Cys Phe Trp Val 405 Glu Leu Ile Arg Gly 410 Arg Pro Lys Glu Lys 415 Thr

Ile Trp Thr Ser 420 Gly Ser Ser Ile Ser 425 Phe Cys Gly Val Asn 430 Ser Asp

Thr Val Gly 435 Trp Ser Trp Pro Asp 440 Gly Ala Glu Leu Pro 445 Tyr Thr Ile

Asp Lys 450

<210> 17  
 <211> 564  
 <212> PRT  
 <213> Virus influenza

5

<400> 17

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

225					230						235				240
Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn
				245					250					255	
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile
			260					265					270		
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly
		275					280					285			
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser
	290					295					300				
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys
305					310					315					320
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Thr
				325					330					335	
Pro	Gln	Arg	Glu	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile
			340					345					350		
Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His
		355					360					365			
Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Glu	Ser	Thr	Gln
	370					375					380				
Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Ile	Ile	Asn	Lys
385					390					395					400
Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	Asn	Leu	Glu
				405					410					415	
Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Gly	Phe	Leu	Asp
			420					425					430		
Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Glu	Asn	Glu	Arg
		435					440					445			
Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Asp	Lys	Val
	450					455					460				
Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe
465					470					475					480
Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu	Ser	Val	Lys	Asn
				485					490					495	
Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	Leu	Asn	Arg
			500					505					510		

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
 515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 545 550 555 560

Arg Ile Cys Ile

<210> 18

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Virus influenza

<400> 18

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val  
 1 5 10 15

Val Gly Ile Ile Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Thr Ile Ser Val  
 20 25 30

Trp Val Ser His Ile Ile Lys Thr Trp His Pro Asn Gln Pro Glu Pro  
 35 40 45

Cys Asn Gln Ser Ile Asn Phe Tyr Thr Glu Gln Ala Ala Ala Ser Val  
 50 55 60

Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala Ile  
 65 70 75 80

Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val Phe  
 85 90 95

Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr  
 100 105 110

Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly  
 115 120 125

Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro Val  
 130 135 140

Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala Trp  
 145 150 155 160

Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Ser Trp Leu Thr Ile Gly Ile  
 165 170 175

Ser Gly Pro Asp 180 Asn Gly Ala Val Ala 185 Val Leu Lys Tyr Asn 190 Gly Ile

Ile Thr Asp 195 Thr Ile Lys Ser Trp 200 Arg Asn Asn Thr Leu 205 Arg Thr Gln

Glu Ser 210 Glu Cys Ala Cys Val 215 Asn Gly Ser Cys Phe 220 Thr Val Met Thr

Asp 225 Gly Pro Ser Asn Glu 230 Gln Ala Ser Tyr Lys 235 Ile Phe Lys Ile Glu 240

Lys Gly Arg Val 245 Val Lys Ser Val Glu 250 Leu Asn Ala Pro Asn 255 Tyr His

Tyr Glu Glu 260 Cys Ser Cys Tyr Pro Asp 265 Ala Gly Glu Ile Thr 270 Cys Val

Cys Arg Asp 275 Asn Trp His Gly Ser 280 Asn Arg Pro Trp Val 285 Ser Phe Asn

Gln Asn 290 Leu Glu Tyr Gln Ile 295 Gly Tyr Ile Cys Ser 300 Gly Val Phe Gly

Asp 305 Ser Pro Arg Pro Asn 310 Asp Gly Thr Gly Ser 315 Cys Gly Pro Val Ser 320

Leu Asn Gly Ala Tyr 325 Gly Val Lys Gly Phe 330 Ser Phe Lys Tyr Gly 335 Asn

Gly Val Trp 340 Ile Gly Arg Thr Lys Ser 345 Thr Ser Ser Arg Ser 350 Gly Phe

Glu Met Ile 355 Trp Asp Pro Asn 360 Gly Trp Thr Glu Thr Asp 365 Ser Ser Phe

Ser 370 Leu Lys Gln Asp Ile 375 Ile Ala Ile Thr Asp 380 Trp Ser Gly Tyr Ser

Gly 385 Ser Phe Ile Gln His 390 Pro Glu Leu Thr Gly 395 Leu Asn Cys Met Arg 400

Pro Cys Phe Trp Val 405 Glu Leu Ile Arg Gly 410 Arg Pro Lys Glu Lys 415 Thr

Ile Trp Thr Ser 420 Gly Ser Ser Ile Ser 425 Phe Cys Gly Val Asn 430 Ser Asp

Thr Val Gly 435 Trp Ser Trp Pro Asp 440 Gly Ala Glu Leu Pro 445 Tyr Thr Ile

Asp Lys

450

<210> 19  
 <211> 558  
 <212> PRT  
 <213> Virus influenza

5

&lt;400&gt; 19

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

Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn  
 245 250 255  
 Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Ile Leu Ser Gly Glu Ser  
 260 265 270  
 His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Asn Ser Gly Ser Cys Val Val  
 275 280 285  
 Gln Cys Gln Thr Glu Arg Gly Gly Leu Asn Thr Thr Leu Pro Phe His  
 290 295 300  
 Asn Val Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Pro Lys Tyr Val Gly Val  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Leu Lys Leu Ala Val Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Arg Ser  
 325 330 335  
 Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp  
 340 345 350  
 Ser Gly Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln  
 355 360 365  
 Gly Val Gly Ile Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Arg Ala Ile Asp  
 370 375 380  
 Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Lys Gln  
 385 390 395 400  
 Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Asn Arg Leu Asn  
 405 410 415  
 Met Ile Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Ile Trp Ala Tyr  
 420 425 430  
 Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr Leu Asp Glu  
 435 440 445  
 His Asp Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys Arg Ala Leu  
 450 455 460  
 Gly Ser Asn Ala Met Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Leu Tyr His  
 465 470 475 480  
 Lys Cys Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn  
 485 490 495  
 Arg Arg Lys Tyr Lys Glu Glu Ser Arg Leu Glu Arg Gln Lys Ile Glu  
 500 505 510

Gly Val Lys Leu Glu Ser Glu Gly Thr Tyr Lys Ile Leu Thr Ile Tyr  
 515 520 525

Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Ile Ala Met Gly Phe Ala Ala Phe  
 530 535 540

Leu Phe Trp Ala Met Ser Asn Gly Ser Cys Arg Cys Asn Ile  
 545 550 555

<210> 20  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Virus influenza

5

<400> 20

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

Ile Ala Thr Ile Cys Leu Leu Met Gln Ile Ala Ile Leu Ala Thr Thr  
 20 25 30

Met Thr Leu His Phe Lys Gln Asn Glu Cys Ile Asn Ser Ser Asn Asn  
 35 40 45

Gln Val Val Pro Cys Glu Pro Ile Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu  
 50 55 60

Ile Val His Leu Asn Ser Thr Thr Leu Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys  
 65 70 75 80

Val Ala Asp Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Gln Ile Thr Gly  
 85 90 95

Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly  
 100 105 110

Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Gly Leu Gly Lys  
 115 120 125

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Glu Asn Lys His  
 130 135 140

Ser Asn Gly Thr Ala His Asp Arg Thr Pro His Arg Thr Leu Leu Met  
 145 150 155 160

Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Ala Thr Lys Gln Val Cys Ile  
 165 170 175

Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val  
 180 185 190

Cys Val Thr Gly Asp Asp Arg Asn Ala Thr Ala Ser Ile Ile Tyr Asp  
 195 200 205

Gly Ile Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Asn Ile Leu Arg  
 210 215 220

Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Ala Val Val  
 225 230 235 240

Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Arg Ala Asp Thr Arg Ile Leu Phe  
 245 250 255

Ile Arg Glu Gly Lys Ile Ala His Ile Ser Pro Leu Ser Gly Ser Ala  
 260 265 270

Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Glu Val Arg  
 275 280 285

Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Leu Tyr  
 290 295 300

Ile Asn Met Ala Asn Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly  
 305 310 315 320

Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Asn Asp Asp Arg Ser Ser Ser Ser Asn  
 325 330 335

Cys Arg Asp Pro Asn Asn Glu Arg Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly Trp  
 340 345 350

Ala Phe Asp Asn Gly Asn Asp Ile Trp Met Gly Arg Thr Ile Lys Lys  
 355 360 365

Asp Ser Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Arg Val Ile Gly Gly Trp Thr  
 370 375 380

Thr Ala Asn Ser Lys Ser Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser  
 385 390 395 400

Asp Asn Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser  
 405 410 415

Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys  
 420 425 430

Glu Thr Arg Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Ile Val Phe Cys Gly  
 435 440 445

Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile  
 450 455 460

Asn Phe Met Pro Ile  
 465

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un virus influenza reagrupado, donde dicho virus comprende 6 segmentos genómicos internos de uno o más virus donantes diferentes de A/Ann Arbor/6/60 y un segmento genómico que codifica un polipéptido HA de la cepa viral A/VN/1203/04, donde el polipéptido HA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11.
- 10 2. El virus influenza reagrupado de la reivindicación 1, que comprende un segmento genómico que codifica un polipéptido NA de la cepa viral A/VN/1203/04, donde el polipéptido NA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 12.
- 15 3. El virus influenza reagrupado de la reivindicación 1 ó 2, donde dicho uno o más virus donantes tienen una o más de las siguientes propiedades: sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, o están atenuados.
- 20 4. El virus influenza reagrupado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho uno o más virus donantes son PR8.
- 25 5. El virus influenza reagrupado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho uno o más virus donantes son A/Leningrad/134/17/57.
- 30 6. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz del virus influenza reagrupado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. El virus influenza reagrupado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de tratamiento estimulando el sistema inmune de un sujeto para producir una respuesta inmune protectora contra el virus influenza, donde el virus influenza reagrupado tiene que administrarse al sujeto en una cantidad inmunológicamente eficaz y en un vehículo fisiológicamente eficaz.
- 40 8. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en un método profiláctico de tratamiento de una infección vírica en un sujeto, donde el virus tiene que administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunogénica contra la infección vírica.
- 45 9. El virus para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho virus está muerto o inactivado.
- 50 10. Una vacuna de influenza atenuado vivo que comprende la composición de la reivindicación 6.
- 55 11. Un método para producir virus influenza en cultivos celulares, comprendiendo el método:
- i) introducir en una población de células hospedadoras, siendo capaz dicha población de células hospedadoras de soportar la replicación de virus influenza, una pluralidad de vectores que comprenden secuencias de ácido nucleico correspondientes a:
    - 45 (a) al menos 6 segmentos genómicos internos de una primera cepa de influenza, donde la primera cepa de influenza no es A/Ann Arbor/6/60; y, al menos un segmento genómico que codifica un antígeno de superficie inmunogénico de influenza de A/VN/1203/04, donde dicho antígeno de superficie comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11; o
    - 50 (b) al menos 6 segmentos genómicos internos de una primera cepa de influenza, donde la primera cepa de influenza no es A/Ann Arbor/6/60 y donde dicha primera cepa de influenza tiene uno o más atributos fenotípicos seleccionados entre el grupo compuesto por: atenuada, adaptada al frío y sensible a la temperatura; y, al menos un segmento genómico que codifica un antígeno de superficie inmunogénico de influenza de A/VN/1203/04, donde dicho antígeno de superficie comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 11,
  - ii) cultivar la población de células hospedadoras a una temperatura inferior a o igual a 35°C en presencia de tripsina; y,
  - 55 iii) recuperar una pluralidad de virus influenza.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, donde dicho antígeno de superficie comprende adicionalmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 12.
- 65 13. Una vacuna de virus dividido o virus inactivado que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 6.

**Figura 1**

HA de tipo silvestre de VN/1203/2004:

**CCT CAA AGA GAG AGA AGA AGA AAA AAG AGA** ↓ **GGA TTA TTT**  
**Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe**

HA modificada:

**CCT CAA AGA GAG ACT** ↓ **CGA GGA TTA TTT**  
**Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe**

↓ Sitio de escisión en los dominios HA1 y HA2.

Los restos que se mutagenizaron están subrayados

Figura 2

Aislamiento de virus a partir de hisopos

Virus	Mortalidad (muertos/totales)	Orofaringeo		Cloacal		Anticuerpo detectado/ total
		n° supresión/ total	Título log <sub>10</sub> medio (EID <sub>50</sub> )	n° supresión/ total	Título log <sub>10</sub> medio (EID <sub>50</sub> )	
H5N1 wt 1997, 2003 y 2004	8/8	8/8	>6,3	8/8	>4,5	NA
H5N1 ca 1997, 2003 y 2004	0/8	0/8	<0,9	0/8	<0,9	0/8

Los pollos se inocularon por vía intranasal con 10<sup>6</sup> TICD<sub>50</sub> de virus.

Figura 3

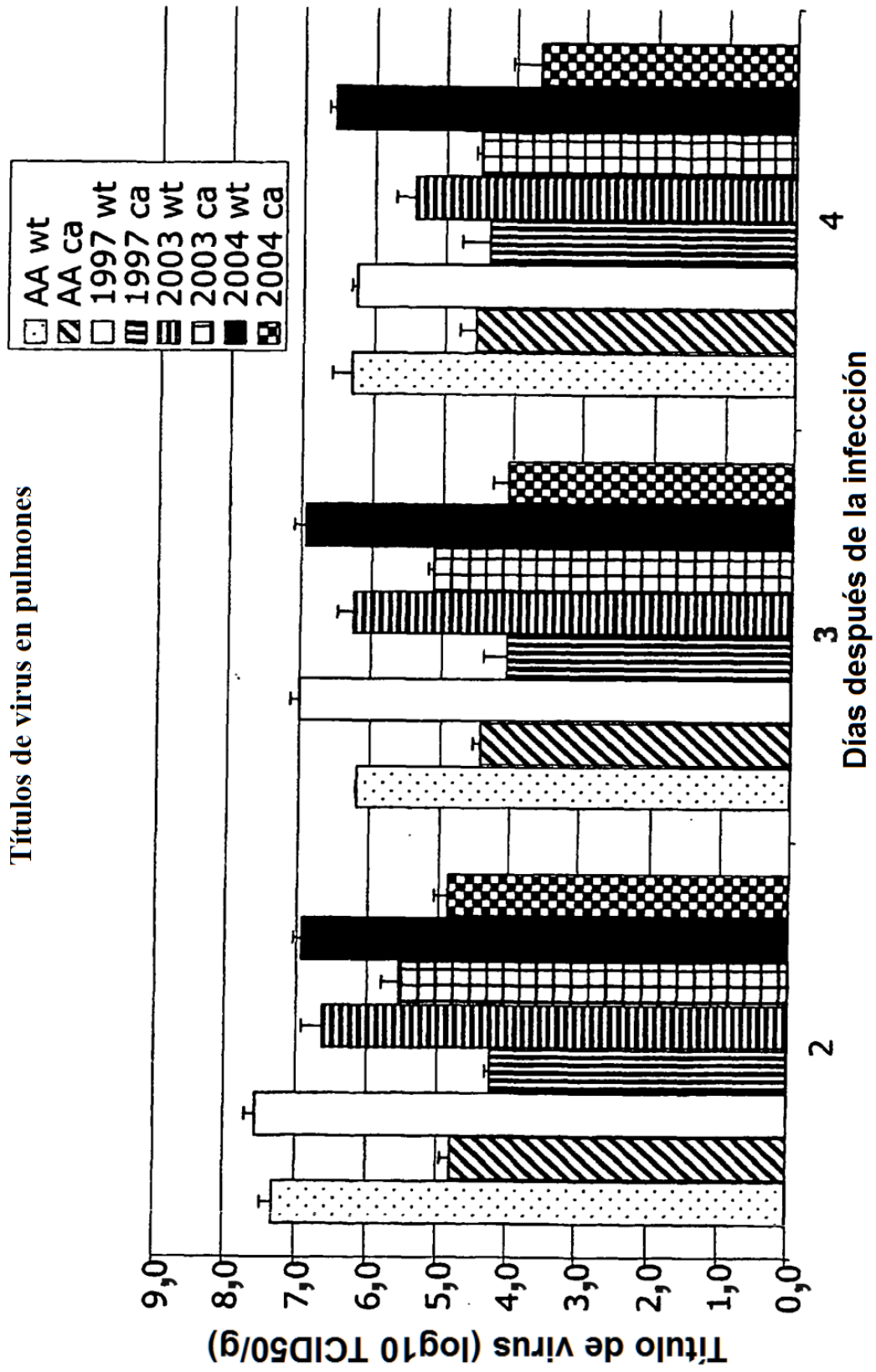
	LD <sub>50</sub> en ratones
<b>A/AA/6/60 ca</b>	<b>&gt;10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub></b>
<b>A/HK/491/97</b>	<b>10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub></b>
<b>1997 H5N1/AA ca</b>	<b>&gt;10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub></b>
<b>A/HK/213/2003</b>	<b>10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub></b>
<b>2003 H5N1/AA ca</b>	<b>&gt;10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub></b>
<b>A/Vietnam/1203/2004</b>	<b>10<sup>0.4</sup> TCID<sub>50</sub></b>
<b>2004 H5N1/AA ca</b>	<b>&gt;10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub></b>

Figura 4

Tejido	Virus	Diferencia en factor promedio en el título sobre 3 días
PULMONES	A/AA/6/60	93
	1997 H5N1	501
	2003 H5N1	12
	2004 H5N1	430
CORNETES NAsALES	A/AA/6/60	32
	1997 H5N1	185
	2003 H5N1	ninguna
	2004 H5N1	100

Se administró por vía intranasal  $10^6$  TCID<sub>50</sub> y se recogieron los tejidos en los días 2, 3 ó 4 después de la infección. Los títulos de virus se expresan como log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/g de tejido.

Figura 5



**Figura 6**

<b>Virus inmunizante</b>	<b>Media geométrica de los títulos de Ab HAI sérico contra el virus indicado</b>		
	<b>1997 wt</b>	<b>2003 wt</b>	<b>2004 wt</b>
<b>2003 ca</b>	<b>20</b>	<b>213,6</b>	<b>20</b>
<b>2003 wt</b>	<b>20</b>	<b>394</b>	<b>20</b>

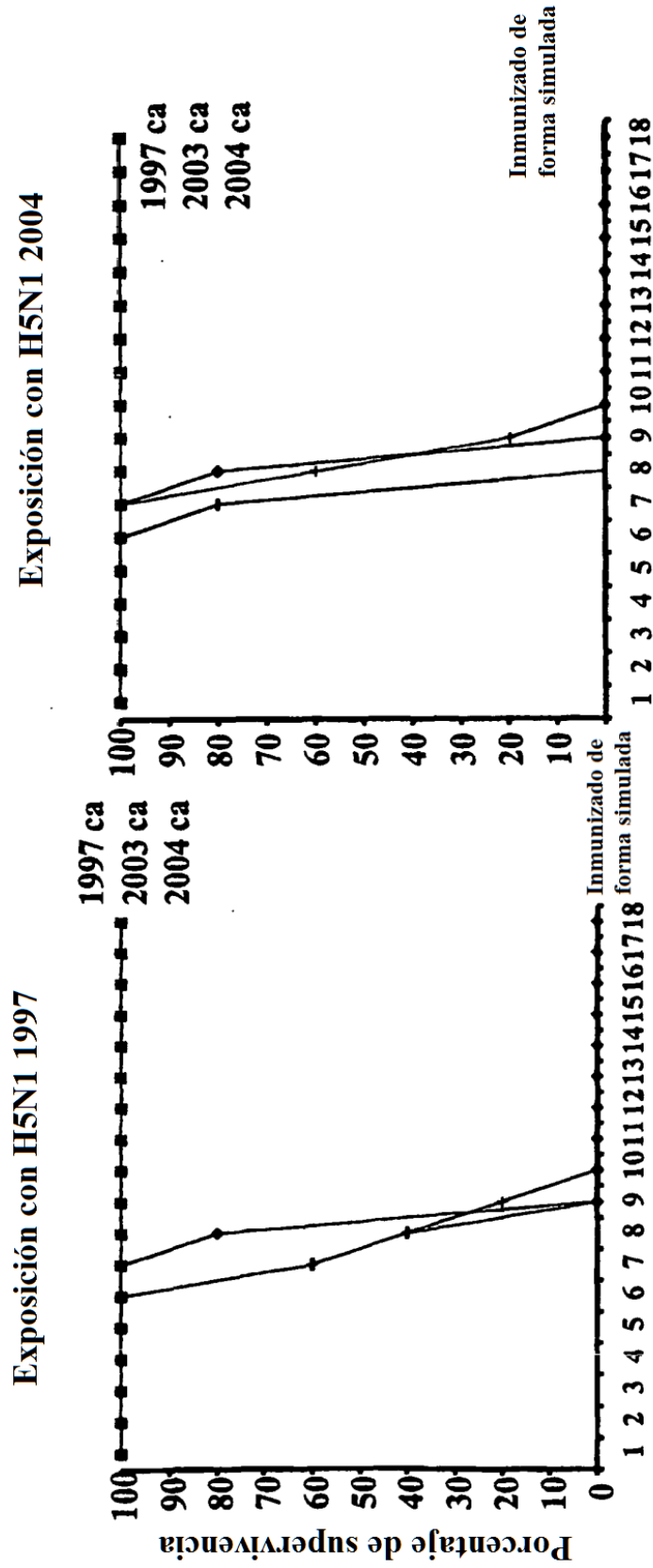
**A un título no detectable se le asigna un valor de 20**

Figura 7

Virus inmunizante	Media geométrica de los títulos de Ab HAI sérico contra el virus indicado		
	1997 wt	2003 wt	2004 wt
2003 ca	10	59,2	10
2003 wt	10	93,3	10

A un título no detectable se le asigna un valor de 10

Figura 8



Días después de la administración del virus de exposición

Figura 9

Reducción media en el título en pulmones después de					
Inmunización	Exposición homóloga	Exposición heteróloga con H5N1			
		1997 wt	2003 wt	2004 wt	
1997 ca	2,5	NA	3,0	0,7	
2003 ca	>5,8	2,3	NA	2,9	
2004 ca	2,0	1,4	>5,7	NA	

Figura 10

Reducción media en el título en pulmones después de					
Inmunización	Exposición homóloga	Exposición heteróloga con H5N1			
		1997 wt	2003 wt	2004 wt	
1997 ca	4,3	NA	>1,2	2,6	
2003 ca	>1,2	3,7	NA	>3,3	
2004 ca	1,6	4,2	>3,5	NA	

Figura 11

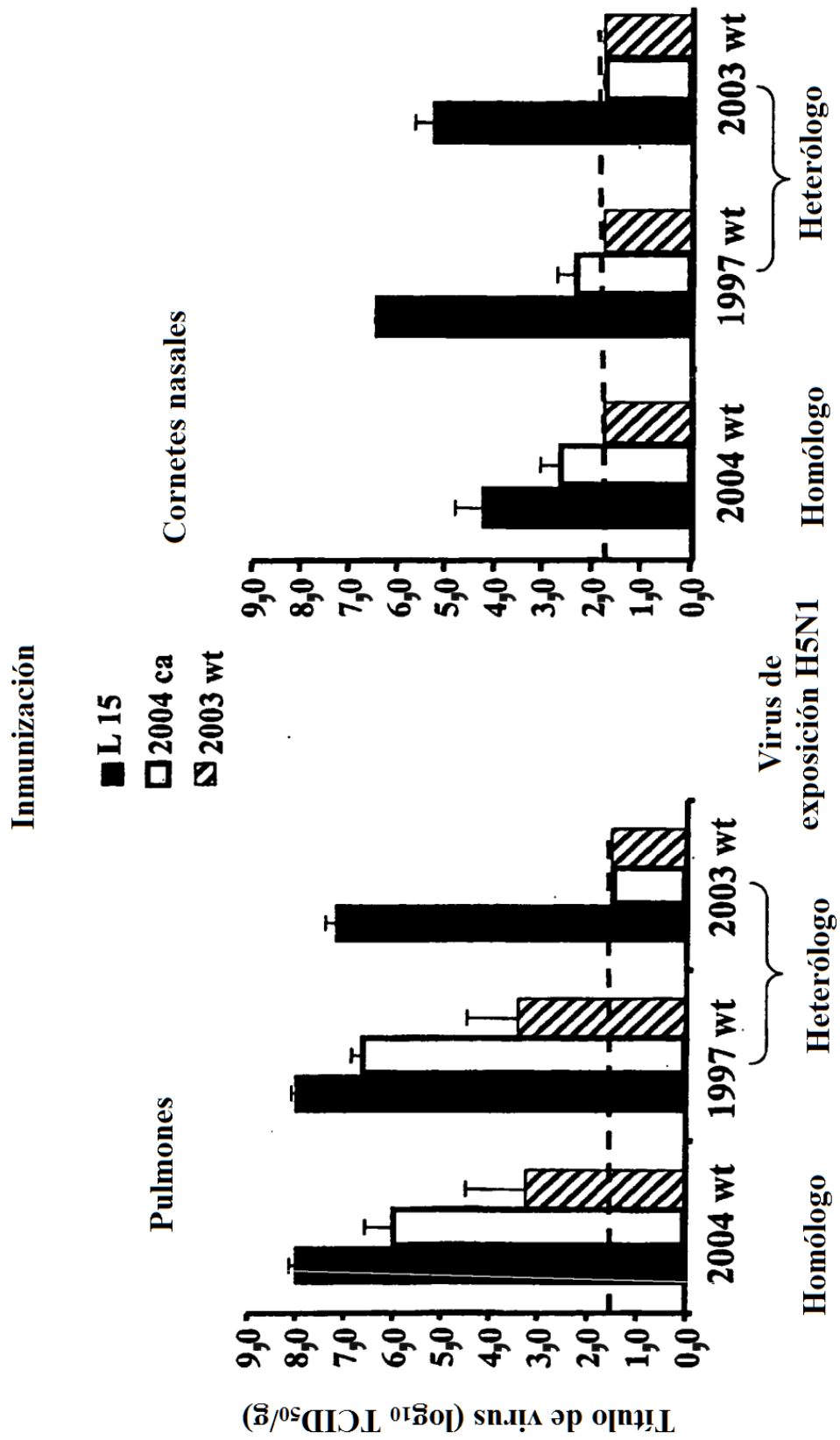


Figura 12

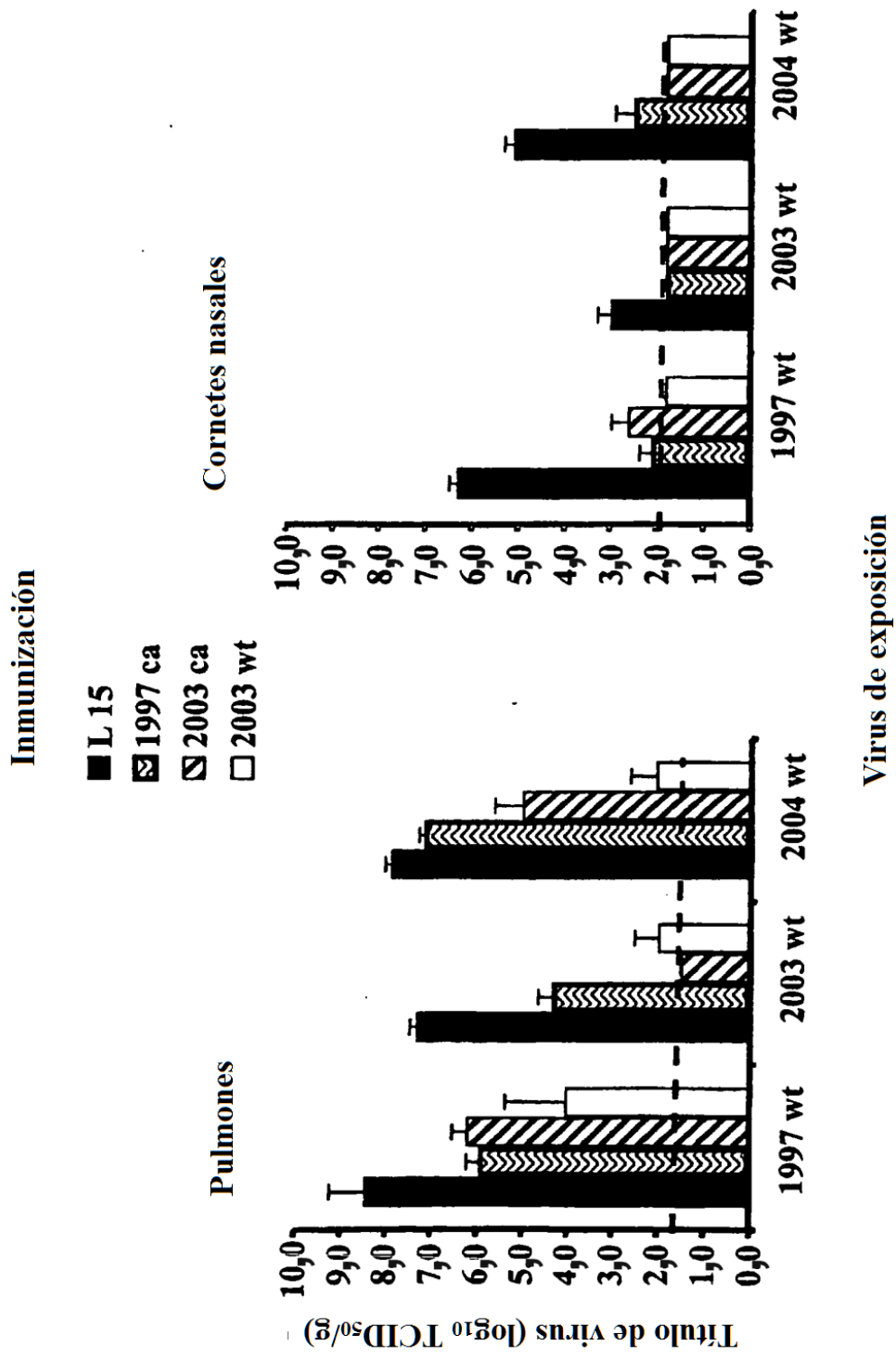
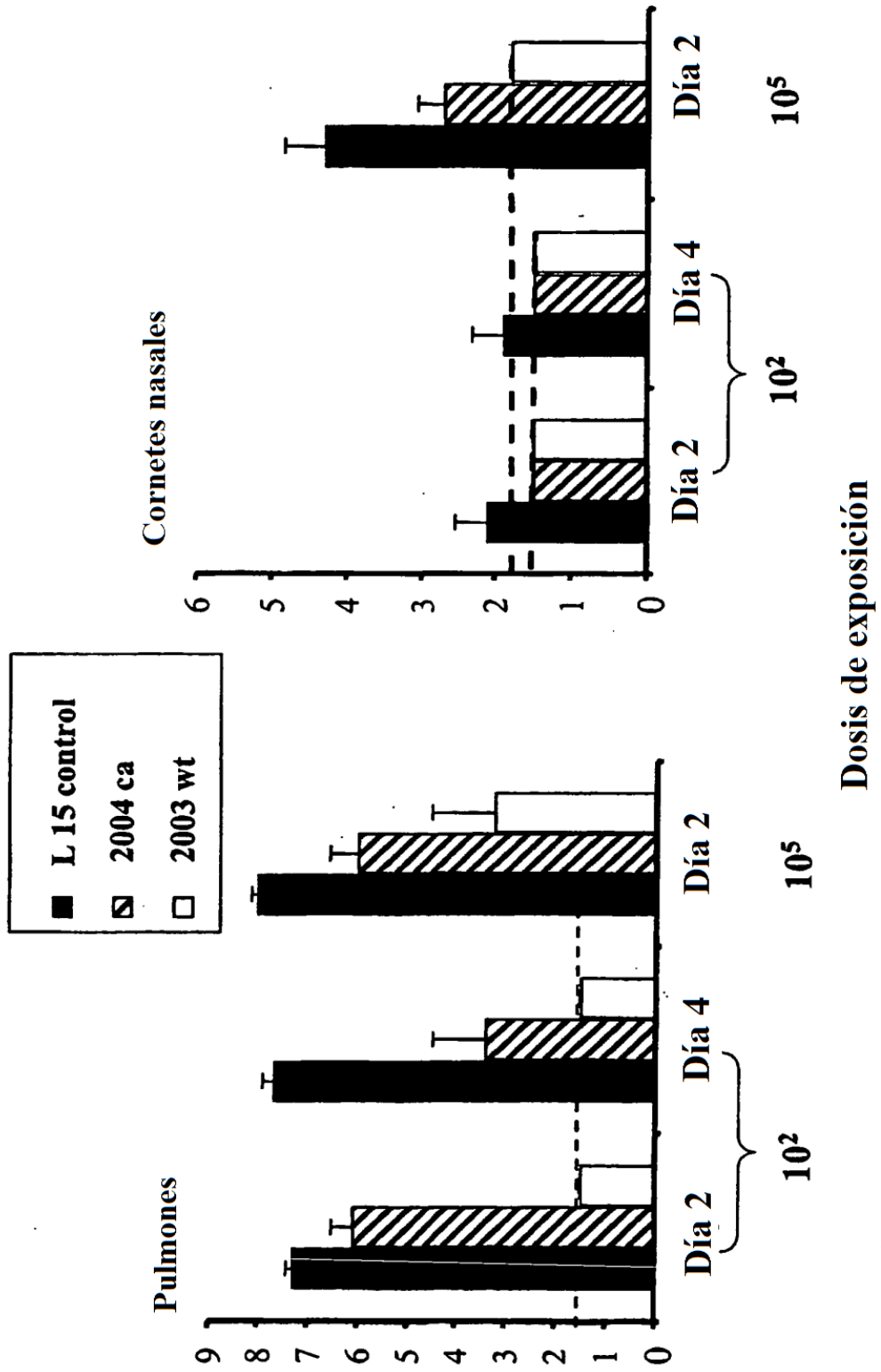


Figura 13



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

### Documentos de patente citados en la descripción

- US 2004029251 A [0002] [0063] [0096] [0105]
- US 2005042229 A [0002] [0096]
- US 20020164770 A [0015] [0096]
- US 20030035814 A [0015] [0096]
- US PN5922326 A [0071]
- US 20040137013 A [0096]
- US 20030147916 A [0096]
- US PN5166057 A, Palese [0100]
- US 5690937 A [0136]
- US 5482856 A [0146]
- US 4634664 A [0146]
- US 4634666 A, Engelman [0146]
- US 60574553 B [0218]
- US 60657554 B [0218]

### 10 Literatura no patente citada en la descripción

- ZOBEL et al. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 3607 [0015] [0096]
- NEUMANN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 9345 [0015]
- FODOR et al. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, 9679 [0015] [0096]
- Fundamental Immunology. Raven Press, 1999 [0059]
- LI et al. *J. of Infectious Diseases*, 1999, vol. 179, 1132-8 [0066]
- WRIGHT et al. *Infect. Immun.*, 1982, vol. 37, 397-400 [0071]
- KIM et al. *Pediatrics*, 1973, vol. 52, 56-63 [0071]
- WRIGHT et al. *J. Pediatr.*, 1976, vol. 88, 931-936 [0071]
- HOFFMANN et al. *Arch Virol.*, December 2001, vol. 146 (12), 2275-89 [0078]
- BEAUCAGE ; CARUTHERS. *Tetrahedron Letts*, 1981, vol. 22 (20), 1859-1862 [0081] [0130]
- NEEDHAM-VAN DEVANTER et al. *Nucl Acids Res*, 1984, vol. 12, 6159-6168 [0081]
- PEARSON ; REGNIER. *J Chrom*, 1983, vol. 255, 137-149 [0081]
- MAXAM ; GILBERT. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1980, vol. 65, 499-560 [0081]
- SCHARF et al. Heat stress promoters and transcription factors. *Results Probl Cell Differ*, 1994, vol. 20, 125-62 [0092]
- KRIEGLER et al. Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes. *Methods in Enzymol*, 1990, vol. 185, 512-27 [0092]
- NEUMANN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 9345 [0096]
- SCHARF D. et al. *Results Probl Cell Differ*, 1994, vol. 20, 125-62 [0099]
- BITTNER et al. *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 153, 516-544 [0099]
- LUYTJES et al. *Cell*, 1989, vol. 59, 1107-1113 [0100]
- ENAMI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 92, 11563-11567 [0100]
- SCHNELL et al. *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 4195-4203 [0100]
- LAWSON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 4477-4481 [0100]
- RADECKE et al. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 5773-5784 [0100]
- BARON ; BARRETT. *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 1265-1271 [0100]
- HOFFMAN ; BANERJEE. *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 3272-3277 [0100]
- DUBIN et al. *Virology*, 1997, vol. 235, 323-332 [0100]
- HE et al. *Virology*, 1997, vol. 237, 249-260 [0100]
- GASSEN et al. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, 10737-44 [0100]
- PARK et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 5537-5541 [0100]
- KATO et al. *Genes to Cells*, 1996, vol. 1, 569-579 [0100]
- FRESHNEY. *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, 1994 [0103]
- PAUL. *Cell and Tissue Culture*. 1975 [0103]
- ADAMS. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*. Elsevier, 1980 [0103]
- Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. MERTEN et al. *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. 1996 [0103]
- LOGAN ; SHENK. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, vol. 81, 3655-3659 [0108]
- PAYNE et al. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. John Wiley & Sons, Inc, 1992 [0112]
- *Plant Cell. Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods* Springer Lab Manual. Springer-Verlag, 1995 [0112]

- The Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993 [0112]
- VAN HEEKE ; SCHUSTER. *J Biol Chem*, 1989, vol. 264, 5503-5509 [0113]
- GRANT et al. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 153, 516-544 [0113]
- Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays. TIJSSSEN. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*. Elsevier, 1993 [0116]
- HAMES ; HIGGINS. *Gene Probes 1*. IRL Press at Oxford University Press, 1995 [0116]
- HAMES ; HIGGINS. *Gene Probes 2*. IRL Press at Oxford University Press, 1995 [0116]
- *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, Inc, 1998 [0118]
- BERGER ; KIMMEL. *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc, vol. 152 [0127]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2000, vol. 1-3 [0127]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc, 2002 [0127]
- SIEBER et al. *Nature Biotechnology*, 2001, vol. 19, 436-460 [0129]
- LING et al. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem*, 1997, vol. 254 (2), 157-178 [0129]
- DALE et al. Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method. *Methods Mol Biol*, 1996, vol. 57, 369-374 [0129]
- I. A. LORIMER ; I. PASTAN. *Nucleic Acids Res*, 1995, vol. 23, 3067-8 [0129]
- W. P. C. STEMMER. *Nature*, 1994, vol. 370, 389-91 [0129]
- ARNOLD. Protein engineering for unusual environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 1993, vol. 4, 450-455 [0129]
- BASS et al. Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities. *Science*, 1988, vol. 242, 240-245 [0129]
- FRITZ et al. Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro. *Nucl Acids Res*, 1988, vol. 16, 6987-6999 [0129]
- KRAMER et al. Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations. *Nucl Acids Res*, 1988, vol. 16, 7207 [0129]
- SAKAMAR ; KHORANA. Total synthesis and expression of a gene for the  $\alpha$ -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin). *Nucl Acids Res*, 1988, vol. 14, 6361-6372 [0129]
- SAYERS et al. Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucl Acids Res*, 1988, vol. 16, 791-802 [0129]
- SAYERS et al. Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide. *Nucl Acids Res*, 1988, vol. 16, 803-814 [0129]
- CARTER. Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors. *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 154, 382-403 [0129]
- KRAMER ; FRITZ. Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 154, 350-367 [0129]
- The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis. KUNKEL. *Nucleic Acids & Molecular Biology*. Springer Verlag, 1987 [0129]
- KUNKEL et al. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 154, 367-382 [0129]
- ZOLLER ; SMITH. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 154, 329-350 [0129]
- CARTER. Site-directed mutagenesis. *Biochem J*, 1986, vol. 237, 1-7 [0129]
- EGHTEADARZADEH ; HENIKOFF. Use of oligonucleotides to generate large deletions. *Nucl Acids Res* 14: 5115 (1986); Mandeck, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 7177-7181 [0129]
- NAKAMAYE ; ECKSTEIN. Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucl Acids Res*, 1986, vol. 14, 9679-9698 [0129]
- WELLS et al. Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin. *Phil Trans R Soc Lond A*, 1986, vol. 317, 415-423 [0129]
- BOTSTEIN ; SHORTLE. Strategies and applications of in vitro mutagenesis. *Science*, 1985, vol. 229, 1193-1201 [0129]
- CARTER et al. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucl Acids Res*, 1985, vol. 13, 4431-4443 [0129]
- GRUNDSTRÖM et al. Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis. *Nucl Acids Res*, 1985, vol. 13, 3305-3316 [0129]
- KUNKEL. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 488-492 [0129]
- SMITH. In vitro mutagenesis. *Ann Rev Genet*, 1985, vol. 19, 423-462 [0129]
- TAYLOR et al. The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA. *Nucl Acids Res*, 1985, vol. 13, 8749-8764 [0129]

- **TAYLOR et al.** The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucl Acids Res*, 1985, vol. 13, 8765-8787 [0129]
- **WELLS et al.** Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*, 1985, vol. 34, 315-323 [0129]
- **KRAMER et al.** The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucl Acids Res*, 1984, vol. 12, 94441-9456 [0129]
- **KRAMER et al.** Point Mismatch Repair. *Cell*, 1984, vol. 38, 879-887 [0129]
- **NAMBIAR et al.** Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein. *Science*, 1984, vol. 223, 1299-1301 [0129]
- **ZOLLER ; SMITH.** Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods in Enzymol*, 1983, vol. 100, 468-500 [0129]
- **ZOLLER ; SMITH.** Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment. *Nucl Acids Res*, 1982, vol. 10, 6487-6500 [0129]
- *Methods in Enzymol*, vol. 154 [0129]
- **NEEDHAM-VANDEVANTER et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1984, vol. 12, 6159-6168 [0130]
- **FROM et al.** *Proc-Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 5824 [0132]
- **KLEIN et al.** *Nature*, 1987, vol. 327, 70-73 [0132]
- **GILIMAN ; SMITH.** *Gene*, 1979, vol. 8, 81 [0133]
- **ROBERTS et al.** *Nature*, 1987, vol. 328, 731 [0133]
- **SCHNEIDER, B. et al.** *Protein Expr Purif*, 1995, vol. 6435, 10 [0133]
- The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage. ATCC, 1992 [0133]
- **WATSON et al.** Recombinant DNA. Scientific American Books, 1992 [0133]
- **SANDANA.** Bioseparation of Proteins. Academic Press, Inc, 1997 [0135]
- **BOLLAG et al.** Protein Methods. Wiley-Liss, 1996 [0135]
- **WALKER.** The Protein Protocols Handbook. Humana Press, 1996 [0135]
- **HARRIS ; ANGAL.** Protein Purification Applications: A Practical Approach. IRL Press, 1990 [0135]
- **HARRIS ; ANGAL.** Protein Purification Methods: A Practical Approach. IRL Press [0135]
- **SCOPES.** Protein Purification: Principles and Practice. Springer Verlag, 1993 [0135]
- **JANSON ; RYDEN.** Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. Wiley-VCH, 1998 [0135]
- **WALKER.** Protein Protocols on CD-ROM. Humana Press, 1998 [0135]
- Vaccine Production. **FURMINGER et al.** Textbook of Influenza. 324-332 [0136]
- Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. **MERTEN et al.** Novel Strategies in Design and Production of Vaccines. 1996, 141-151 [0136]
- **TYMMS.** In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology. Garland Publishing, 1995, vol. 37 [0137]
- **STEWART et al.** Solid-Phase Peptide Synthesis. WH Freeman Co, 1969 [0138]
- **MERRIFIELD J.** *J Am Chem Soc*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0138]
- **WALKER.** Protein Protocols on CD-ROM. Human Press, 1998 [0140]
- **COLIGAN.** Current Protocols in Immunology. Wiley/Greene, 1991 [0145]
- Fundamental Immunology. Lippincott-Raven, Lippincott Williams & Wilkins, 1998 [0145]
- **HARLOW ; LANE.** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0145]
- Basic and Clinical Immunology. Lange Medical Publications [0145]
- **GODING.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986 [0145]
- **KOHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0145]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0145]
- **WARD et al.** *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0145]
- Antibody Engineering. Freeman and Company, 1995 [0146]
- **MCCAFFERTY et al.** Antibody Engineering. A Practical Approach. IRL at Oxford Press, 1996 [0146]
- **PAUL.** Antibody Engineering Protocols. Human Press, 1995 [0146]
- **OSTBERG et al.** *Hybridoma*, 1983, vol. 2, 361-367 [0146]
- **HARLOW ; LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, 1988 [0150]
- **SMITH ; WATERMAN.** *Adv Appl Math*, 1981, vol. 2, 482 [0168]
- **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** *J Mol Biol*, 1970, vol. 48, 443 [0168]
- **PEARSON ; LIPMAN.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0168]
- **ALTSCHUL et al.** *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, 403-410 [0169]
- **HENIKOFF ; HENIKOFF.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 89, 10915 [0169]
- **KARLIN ; ALTSCHUL.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 5873-5787 [0170]
- **FENG ; DOOLITTLE.** *J. Mol. Evol.*, 1987, vol. 35, 351-360 [0171]
- **HIGGINS ; SHARP.** *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0171]
- **THOMPSON, J. D. et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1994, vol. 22, 4673-4680 [0172]
- **HENIKOFF ; HENIKOFF.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10915-10919 [0172]