

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 937**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05076536 .1**
96 Fecha de presentación: **26.05.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **1605052**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **UN MÉTODO PARA PRODUCIR VACUNAS ANTIGRIPALES POLIVALENTES A BASE DE HEMAGLUTININA.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2011

73 Titular/es:
**PROTEIN SCIENCES CORPORATION
1000 RESEARCH PARKWAY
MERIDEN, CT 06450, US**

72 Inventor/es:
**Smith, Gale Eugene;
Volvovitz, Franklin;
Wilkinson, Bethanie E.;
Voznesensky, Andrei I. y
Hackett, Craig Stanway**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 937 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

Un método para producir vacunas antigripales polivalentes a base de hemaglutinina.

Antecedentes de la invención

La presente invención se sitúa de manera general en el área de las vacunas recombinantes de la gripe.

5 La gripe epidémica se produce anualmente y es causa de una morbilidad y una mortalidad significativas en todo el mundo. Los menores son los que presentan la mayor tasa de ataque, y son los principales responsables de la transmisión de los virus de la gripe en la sociedad. Los mayores y las personas que padecen problemas de salud presentan un riesgo incrementado de padecer complicaciones y necesitar hospitalización tras una infección de gripe. Sólo en los Estados Unidos, se produjeron más de 10.000 muertes durante cada una de las siete temporadas de gripe en el periodo 1956-1988 debido a neumonía y gripe, y más de 40.000 muertes en cada una de dos temporadas (Actualización: Influenza Activity – United States and Worldwide, y Composition of the 1992-1993 Influenza Vaccine, Morbidity and Mortality Weekly Report. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 41/Nº 18: 315-323, 1992). Los virus de la gripe son partículas altamente pleomórficas compuestas por dos glicoproteínas superficiales, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). La HA media en la unión del virus a la célula hospedante y en la fusión virus-membrana celular durante la penetración del virus en la célula. El genoma del virus de la gripe consta de ocho segmentos de ARN de sentido negativo de cadena sencilla, de los cuales el cuarto segmento en tamaño codifica el gen de HA. Los virus de la gripe se dividen en los tipos A, B y C, en base a diferencias antigénicas. Los virus de la gripe A se describen mediante una nomenclatura que incluye el subtipo o tipo, el origen geográfico, el número de cepa y el año de aislamiento, por ejemplo, A/Pekín/353/89. Existen al menos 13 subtipos de HA (H1-H13) y nueve subtipos de NA (N1-N9). Todos los subtipos se encuentran en aves, pero sólo los H1-H3 y los N1-N2 se dan en humanos, cerdos y caballos (Murphy y Webster, "Orthomyxoviruses", en Virology, ed. Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., 1091-1152 (Raven Press, Nueva York, (1990)).

Los anticuerpos de HA neutralizan el virus y forman la base de la inmunidad natural frente a la infección de gripe (Clements, "Influenza Vaccines", en *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, ed. Ronald W. Ellis, páginas 129-150 (Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA 1992)). La variación antigénica de la molécula de HA es la responsable de los brotes frecuentes de gripe y del limitado control de la infección mediante inmunización.

La estructura tridimensional de la HA y la interacción con su receptor celular, el ácido siálico, ha sido ampliamente estudiada (Wilson y col., "Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A° resolution", Nature 289: 366-378 (1981); Weis y col., "Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid", Nature, 333: 426-431 (1988); Murphy y Webster, 1990). La molécula de HA está presente en el virión en forma de trímero. Cada monómero existe en forma de dos cadenas, HA1 y HA2, unidas mediante un único enlace de disulfuro. Las células hospedantes infectadas producen un polipéptido precursor glicosilado (HA0) con un peso molecular de aproximadamente 85.000, que posteriormente se divide en HA1 y HA2.

La presencia de anticuerpo IgG e IgA neutralizante específico de la gripe está asociada a resistencia a la infección y a la enfermedad (Clements, 1992). Las vacunas de la gripe de virus entero desactivado o parcialmente purificado (subunidad de separación) están estandarizadas a la cantidad de HA de cada cepa. Las vacunas de la gripe habitualmente incluyen de 7 a 25 microgramos de HA de cada una de tres cepas de gripe.

El papel de la otra glicoproteína principal, la NA, en la inmunidad protectora de respuestas de anticuerpo o de células T contra la gripe no ha sido definido. La neuraminidasa es muy lábil al proceso de purificación y almacenamiento (Murphy y Webster, 1990) y la cantidad de NA en la vacuna previene la enfermedad en animales expuestos a la gripe (Johansson y col., "Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection", J. Virology, 63: 1239-1246 (1989)). Una vacuna experimental basada en antígeno de neuraminidasa no resultó protectora en un ensayo con humanos (Orga y col., J. Infect. Dis. 135: 499-506 (1977)).

Las vacunas contra la gripe licenciadas consisten en preparaciones enteras desactivadas con formalina o de subunidades separadas químicamente de virus de dos subtipos de gripe A (H1N1 y H3N2) y de un subtipo de gripe B. Antes de cada temporada de gripe, el U.S. Food and Drug Administration's Vaccines and Related Biologicals Advisory Committee recomienda la composición de una vacuna trivalente contra la gripe para la nueva temporada. La vacuna de 1992-93 contenía los virus H1N1 tipo A/Texas/36/91, H3N2 tipo A/Pekín/353/89 y B/Panamá/45/90. La FDA ha aconsejado que la vacuna contra la gripe de 1993-94 debería contener las mismas cepas de Texas y Panamá y una nueva cepa de gripe A de Pekín (A/Pekín/32/92).

La vacunación de personas con riesgo elevado cada año antes de la temporada de gripe es la medida más eficaz para reducir el impacto de la gripe. Las limitaciones de las vacunas disponibles actualmente incluyen tasas de utilización bajas; baja eficacia en personas mayores y en niños pequeños; producción en huevos; variación antigénica y reacciones adversas.

El Centro para el Control de Enfermedad ("Center for Disease Control", CDC) estima que menos del 30% de los

individuos de alto riesgo frente a la gripe son vacunados cada año (MMWR, 1992). Las vacunas desactivadas actuales alcanzan una elevada tasa de protección contra la enfermedad entre adultos sanos normales cuando los antígenos de la vacuna y los de la gripe en circulación están estrechamente relacionados. Entre los mayores, la tasa de protección contra la enfermedad es mucho menor, especialmente para aquellos que están institucionalizados (Clements, 1992). En un estudio reciente de Powers y Belshe, J. Inf. Dis. 167: 584-592 (1993), se observaron respuestas de anticuerpo significativas a una vacuna contra la gripe de subvirión trivalente en menos del 30 por ciento de los sujetos de 65 años o más.

Los virus de simiente para las vacunas de gripe A y B son cepas naturales que se replican con altos valores en la cavidad alantoica de huevos de pollos. Alternativamente, la cepa para el componente de gripe A es un virus reordenante con los genes antígenos superficiales correctos. Un virus reordenante es aquel que, debido a la segmentación del genoma vírico, tiene las características de cada cepa original. Cuando más de una cepa vírica de gripe infectan a una célula, estos segmentos víricos se mezclan para crear un virión de progenie que contiene varias clasificaciones de genes de ambos orígenes.

La protección con las vacunas actuales contra la gripe, totales o de división, es de vida corta y decae según se produce la deriva antigénica en las cepas epidémicas de gripe. Los virus de la gripe sufren una deriva antigénica como resultado de la selección inmune de virus con cambios en la secuencia de aminoácidos en la molécula de hemaglutinina. Idealmente, las cepas de la vacuna coinciden con las cepas del virus de la gripe que provoca la enfermedad. El proceso actual de fabricación de vacunas de la gripe, sin embargo, está limitado por la propagación del virus en huevos de pollo embrionado. No todas las cepas de virus de la gripe se replican bien en huevos; por tanto los virus deben adaptarse o se deben construir reordenamientos víricos. En la hemaglutinina de los virus cultivados en huevo se produce una heterogeneidad extensiva, en comparación con los elementos aislados primarios de los individuos infectados cultivados en células de mamífero (Wang y col., Virology 171: 275-279 (1989); Rajakumar y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4154-4158 (1990)). Los cambios en la HA durante la selección y fabricación de vacunas de la gripe puede dar como resultado una mezcla de subpoblaciones antigénicamente distintas del virus. Los virus de la vacuna pueden, por lo tanto, diferir de las variantes presentes en las cepas epidémicas, dando como resultado niveles de protección no óptimos.

En personas que tengan una alergia grave al huevo se pueden producir reacciones inmediatas de hipersensibilidad debido a la presencia de proteína de huevo residual en la vacuna. La vacuna contra la gripe porcina de 1976 se asoció a un aumento de la frecuencia del síndrome de Guillain-Barré. De momento, no se ha observado que las vacunas posteriores preparadas a partir de otras cepas de gripe hayan aumentado la probabilidad de padecer esta enfermedad rara.

Un método para producir una vacuna contra la gripe que no requiere la propagación en huevos daría como resultado un producto más puro que tendría menos probabilidad de causar una reacción inmune adversa. Adicionalmente, una preparación de vacuna más pura no requeriría la desactivación del virus o una extracción orgánica de los componentes de la membrana vírica, evitando con ello la desnaturalización de epítomos antigénicos y preocupaciones de seguridad debidas a productos químicos residuales presentes en la vacuna.

Además, una vacuna contra la gripe producida en ausencia de propagación en huevo evitaría la heterogeneidad genética que se produce durante la adaptación y el paso a través de los huevos. Esto daría como resultado una vacuna que se ajusta mejor a las cepas de gripe epidémicas, dando como resultado una mejor eficacia.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir una vacuna contra la gripe que no requiera de replicación en huevos.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de producción de una vacuna contra la gripe que sea rápida y económica, altamente purificada y que permita la producción de vacunas a partir de fuentes primarias de gripe.

El artículo *Virus Research* (1986) 5: 43-59 describe la expresión en la superficie celular de hemaglutinina de virus de la gripe en células de insecto usando un vector de baculovirus. El artículo *J. Gen. Virol.* (1987) 68: 1233-1250 describe el uso de vectores de baculovirus para la expresión del gen de hemaglutinina de gripe A en células de *Spodoptera frugiperda*. El artículo *EMBO J.* (1986) 5: 1359-1366 describe la expresión de hemaglutinina de virus de la gripe (plaga aviar) en células de *S. frugiperda* mediante un vector de baculovirus, y la inmunización de pollos con células de *S. frugiperda* que expresan la hemaglutinina. El documento EP0546787 describe la expresión en un sistema de baculovirus en células Sf9 de una secuencia de hemaglutinina de 1,75 kb o de una proteína quimérica que comprende epítomos de VIH insertados en el gen de hemaglutinina. El artículo *Virology* (1994) 202: 586-605 describe la secuencia de ADN completa del virus de polihedrosis nuclear de baculovirus de *Autographa californica* (AcNPV).

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para fabricar una proteína de fusión de hemaglutinina, un método para fabricar un vector, una proteína recombinante de fusión de hemaglutinina de la gripe y una composición de vacuna

tal como se define en las reivindicaciones anexas.

Se proporciona un método para preparar una proteína recombinante de hemaglutinina de gripe mediante expresión en células de insecto usando un sistema de expresión de baculovirus. La proteína resultante es útil para fabricar una vacuna multivalente contra la gripe basada en una mezcla de antígenos recombinantes de hemaglutinina clonados de virus de la gripe que tienen potencial epidémico. Las proteínas recombinantes de hemaglutinina son glicoproteínas no divididas (HA0), de longitud completa, que incluyen ambas subunidades HA1 y HA2 (HA0) purificadas en condiciones no desnaturalizantes hasta una pureza de un 95% o superior, preferiblemente una pureza del 99%.

También se describe un proceso para clonar genes de hemaglutinina de gripe procedentes de virus de la gripe A y B usando sondas de oligonucleótido diseñadas específicamente y metodología de reacción en cadena de polimerasa (PCR). En la realización preferida, los genes de HA clonados se modifican mediante eliminación de los nucleótidos que codifican las secuencias de péptido señal hidrofóbico natural, y sustitución con un nuevo péptido señal de baculovirus, para producir una secuencia que codifica el péptido señal que corta inmediatamente la hemaglutinina. Estos genes quiméricos se introducen en vectores de expresión de baculovirus de tal modo que el promotor de polihedrina de baculovirus dirige la expresión de proteínas recombinantes HA en células de insecto infectadas. El péptido señal de baculovirus de 18 aminoácidos dirige la traducción de rHA en el mecanismo de glicosilación de la célula de insecto y no está presente en la glicoproteína rHA madura. En la realización preferida, se diseña un vector que no codifica ningún aminoácido interviniente entre el péptido señal y la proteína de hemaglutinina.

Se puede extender esta metodología a todos los tipos de virus de la gripe, incluyendo, aunque sin limitación, el subtipo prevalente A (H1N1), el subtipo A(H3N2) y el tipo B que infecta humanos, así como los virus de la gripe que infectan otras especies de mamíferos y de aves.

Se describe una estrategia general para la extracción y la purificación eficientes de proteína HA recombinante producida en células de insecto, para la purificación de proteínas rHA procedentes de virus de la gripe de los subtipos A y del tipo B. La vacuna recombinante puede desarrollarse a partir de fuentes primarias de gripe, por ejemplo, secreciones nasales de individuos infectados, más que de virus adaptados y cultivados en huevos de pollos. Esto permite un rápido desarrollo de la vacuna directamente a partir de las cepas epidémicas de gripe, y evita los problemas que surgen de la adaptación del virus para su cultivo en huevos, así como la reacción del paciente frente a contaminación de huevo en la vacuna resultante.

Los ejemplos demuestran la formulación y la eficacia clínica de la vacuna en una forma de dosis de inmunización que incluye antígenos de rHA purificados procedentes de tres cepas de virus de la gripe recomendadas por la FDA para las temporadas epidémicas 1993/1994 y 1994/1995. Se midió la inmunidad funcional usando ensayos que cuantifican anticuerpos que se unen a hemaglutinina de gripe, que bloquean la capacidad del virus de la gripe para aglutinar células sanguíneas rojas, o que neutralizan el virus de la gripe. Se midieron las respuestas inmunes protectoras con vacunas de rHA en animales que son susceptibles a la infección de gripe, o en estudios de exposición de humanos.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es un esquema de la clonación de genes HA de cepas de gripe A procedentes de preparaciones de ARN víricas purificadas, de la purificación de rHA expresada y de la caracterización biológica de rHA. Abreviaturas: FDA, Administración de Alimentos y Fármacos o "Food and Drug Administration"; MDCK, riñón canino Madin Darby o "Madin Darby Canine Kidney"; TPCK, tosilfenilalanil clorometilcetona; ARN, ácido ribonucleico; ADNc, ácido desoxirribonucleico complementario; HA, hemaglutinina; FBS, suero fetal bovino; PCR, Reacción en cadena de polimerasa; y BV, Baculovirus.

La Figura 2 es un esquema más detallado del método de la Figura 1 aplicado a la clonación y la expresión del gen de HA de la cepa de gripe A/Texas/36/91. El gen de HA de gripe se obtuvo a partir de ARN purificado procedente de células MDCK infectadas con gripe A/Texas/36/91 usando transcriptasa inversa y un cebador universal (SEC ID N°: 1) seguido de dos rondas de amplificación mediante PCR y clonación. Tal como se muestra, en la primera ronda de reacciones PCR se usaron el cebador de extremo 5' SEC ID N°: 2 y el cebador de extremo 3' SEC ID N°: 3. En la segunda ronda de reacciones PCR, se usaron el cebador de extremo 5' SEC ID N°: 4 y el cebador de extremo 3' SEC ID N°: 5. Se construyó un vector de recombinación de baculovirus que contenía el promotor de polihedrina y una secuencia de péptido señal procedente del gen de baculovirus de 61K (un gen de baculovirus que codifica un péptido señal que tiene un peso molecular de aproximadamente 61.000), seguido de las secuencias de codificación completas para la proteína HA madura. Este vector de recombinación se usó a continuación para fabricar un vector de expresión de baculovirus que produce HA a partir de esta cepa del virus.

La Figura 3 es un gráfico de la respuesta inmune anti-HA en ratones, día 42, n=5, que representa el título de anticuerpos para rHA0-puro; vacuna Fluzone® y rHA0-alum, a dosis de 0,5 µg (barras oscuras), 0,1 µg (barras sombreadas), 0,02 µg (barras punteadas) y 0,004 µg (barras huecas).

Las Figuras 4a, 4b y 4c son gráficos de la respuesta inmune anti-Ha en ratones inmunizados con rHA o con vacuna

trivalente licenciada, fórmula de 1994-1995, semanas después de la vacunación frente a título de HIA, para HAI A/Texas/36/91 (Figura 4a), HAI A/Shangdong/9/93 (Figura 4b), y HAI B/Panamá/45/90 (Figura 4c), rHA (diamantes) y vacuna FLUVIRON® atenuada cultivada en huevos (cuadrados).

Descripción detallada de la invención

5 Se describe un método para preparar una vacuna recombinante contra la gripe. Se produce un antígeno de hemaglutinina sin dividir (HA0) de longitud completa a partir de un virus de la gripe con vectores de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas y se purifica en condiciones no desnaturalizantes. Se mezclan dos o más antígenos de hemaglutinina purificados procedentes de cepas de gripe A y/o B para producir una vacuna multivalente contra la gripe. Los antígenos recombinantes pueden combinarse con un vehículo adyuvante para
10 aumentar la eficacia.

El uso de tecnología de ADN recombinante para producir vacunas contra la gripe ofrece varias ventajas: una vacuna contra la gripe de ADN recombinante puede producirse en condiciones más seguras y más controlables; no se requiere la propagación con gripe infecciosa en huevos; la proteína recombinante HA puede purificarse más eficazmente, eliminando de forma virtual los efectos secundarios debidos a la presencia de proteínas contaminantes; los procedimientos de purificación para HA recombinante no tienen que incluir la desactivación del virus o la extracción orgánica de componentes de la membrana vírica, evitando con ello la desnaturalización de antígenos y otras preocupaciones de seguridad debidas a la presencia de productos químicos residuales en la vacuna; la producción de HA mediante tecnología de ADN recombinante proporciona una oportunidad para evitar la heterogeneidad genética que se produce durante la adaptación y el paso a través de los huevos, lo que debería
15 posibilitar un mejor ajuste de las cepas de la vacuna a las cepas epidémicas de gripe, dando como resultado una mejora de la eficacia; y una estrategia recombinante también puede permitir la selección de la cepa más tarde en el calendario, permitiendo con ello tiempo para realizar selecciones en base a datos epidemiológicos más fiables.

Sistema de expresión de baculovirus

25 Los baculovirus son virus de ADN de la familia *Baculoviridae*. Se sabe que estos virus tienen un espectro de hospedante estrecho que se limita principalmente a especies Lepidópteras de insectos (mariposas y polillas). El baculovirus Virus de Poliédrosis Nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), que se ha convertido en el prototipo de baculovirus, se replica de manera eficiente en células susceptibles de insecto cultivadas. El AcNPV tiene un genoma de ADN circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 130.000 pares base y está bien caracterizado en cuanto a espectro de hospedantes, biología molecular y genética.

30 Muchos baculovirus, incluyendo el AcNPV, forman grandes oclusiones cristalinas de proteínas dentro del núcleo de las células infectadas. Un único polipéptido, denominado polihedrina, constituye aproximadamente el 95% de la masa proteica de estos cuerpos de oclusión. El gen para la polihedrina está presente como una copia sencilla en el genoma vírico del AcNPV. Debido a que el gen de polihedrina no es esencial para la replicación del virus en las células cultivadas, puede modificarse fácilmente para expresar genes externos. La secuencia del gen externo es insertada en el gen de AcNPV justo en posición 3' respecto a la secuencia promotora de polihedrina, de tal modo que se encuentra bajo el control transcripcional del promotor de polihedrina.
35

Los baculovirus recombinantes que expresan genes externos se construyen mediante recombinación homóloga entre ADN de baculovirus y plásmidos quiméricos que contienen la secuencia génica de interés. Los virus recombinantes se pueden detectar en virtud de su morfología de plaqueta distinta y se pueden purificar mediante
40 plaqueta hasta homogeneidad.

Los baculovirus son particularmente adecuados para uso como vectores de clonación y de expresión eucarióticos. Generalmente son seguros debido a su estrecho espectro de hospedantes, que se restringe a los artrópodos. La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) ha aprobado el uso de tres especies de baculovirus para el control de plagas de insectos. El AcNPV se ha aplicado a cultivos durante muchos años bajo Permisos de Uso
45 Experimental de la EPA.

Los virus de AcNPV naturales y recombinantes se replican en una variedad de células de insecto, que incluyen líneas celulares continuas derivadas del gusano soldado otoñal, *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera; Noctuidae). Las células de *S. frugiperda* tienen un tiempo de doblado de población de 18 a 24 horas y pueden propagarse en cultivos de monocapa o de suspensión libre.

50 Las proteínas HA recombinantes pueden producirse, aunque sin limitación, en células derivadas de la especie Lepidóptera *Spodoptera frugiperda*. También se podrían usar otras células de insecto que pueden ser infectadas por baculovirus, tales como las de las especies *Bombix mori*, *Galleria mellanoma*, *Trichplusia ni* o *Lamantaria dispar*, como sustrato adecuado para producir proteínas HA recombinantes.

La línea celular hospedante preferida para la producción de baculovirus recombinantes es la Sf900+. Otra línea celular hospedante para la producción de proteína a partir de baculovirus recombinantes es la Sf9. La Sf900+ y Sf9 son líneas celulares continuas no transformadas no tumorigénicas derivadas del gusano soldado otoñal,
55

Spodoptera frugiperda (Lepidóptero; Noctuidae). Las células Sf900+ y Sf9 se propagan a 28±2°C sin suplemento de dióxido de carbono. El medio de cultivo usado para las células Sf9 es TNMFH, una mezcla simple de sales, vitaminas, azúcares y aminoácidos, suplementada con suero fetal bovino al 10%. Aparte del suero fetal bovino, en la propagación celular no se usa ningún otro producto derivado de animal (es decir, tripsina, etc.). También se puede usar medio de cultivo libre de suero (disponible como medio de cultivo de Sf900, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) para cultivar células Sf9, y es preferible para la propagación de células de Sf900+.

Las células Sf9 tienen un tiempo de duplicado de población de 18-24 horas y se pueden propagar en cultivos monocapa o de suspensión libre. No hay datos que indiquen que las células de *S. frugiperda* apoyen la replicación de cualquier virus de mamífero conocido.

Los especialistas en la técnica entenderán que el vector de expresión no está limitado a un sistema de expresión de baculovirus. Las proteínas HA recombinantes también pueden expresarse en otros vectores de expresión tales como los virus Entomopox (virus de la viruela de insectos), virus de polihedrosis citoplásmica (CPV) y transformación de células de insecto con expresión constitutiva del gen o genes de HA recombinante.

Aislamiento de cepas de gripe

Se aíslan una o más cepas de gripe a partir de individuos infectados con la enfermedad. Preferiblemente, las cepas de gripe son aquellas identificadas por la FDA o por el CDC con potencial epidémico para la siguiente temporada de gripe. Una ventaja del método descrito en la presente memoria es que se pueden usar muestras clínicas, tales como secreciones nasales de pacientes infectados con gripe, como fuente directa de virus. Alternativamente, se pueden obtener de la FDA o del CDC.

Propagación de cepas de gripe.

Las cepas se propagan a continuación en células que producen títulos elevados de virus, tal como células de riñón canino Madin Darby (MDCK) (disponibles en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso ATCC CCL34). Por ejemplo, se infectan células MDCK en presencia de concentraciones de tosilfenilalanil clorometilcetona (TPCK), tripsina parcialmente desactivada y suero fetal bovino optimizadas para producir los mayores títulos de virus de primer pasaje. Las células MDCK se infectan con las cepas de gripe con una baja multiplicidad de infección (de 0,1 a 0,5) tal como se determina mediante un ensayo de HA estándar (Rosen, "Hemagglutination with Animal Viruses" en *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel y N.P. Salzman, páginas 276-28 (Academic Press, Nueva York 1969). Las células infectadas se incuban a 33°C durante 48 horas, y los medios son evaluados para la producción de virus usando el ensayo de actividad de hemaglutinación. A continuación, se usan las condiciones que producen la mayor actividad de HA para preparar grandes cantidades de virus de la gripe.

Purificación del virus

Las partículas víricas producidas a partir del primer pasaje son purificadas del medio usando un método de purificación conocido tal como la centrifugación de gradiente de densidad de sacarosa. Por ejemplo, el virus se cosecha 24-48 horas después de la infección mediante medio de centrifugación de células MDCK infectadas con gripe. La partícula vírica resultante se vuelve a suspender en tampón y se centrifuga a través de un gradiente de sacarosa tamponado. La banda de virus de la gripe se recolecta de la región del 40-45% de sacarosa del gradiente, se diluye con tampón y se convierte en partícula mediante centrifugación a 100.000 x g. La partícula de virus purificada se vuelve a suspender en tampón y se almacena a -70°C.

Clonación de genes de hemaglutinina de gripe

En la Figura 1 se proporciona una visión general de los métodos para la clonación de genes de HA. Básicamente, las células son infectadas con la cepa de gripe que se va a clonar. El virus es recolectado del medio celular y se aísla el ARN vírico, para las cepas de gripe A, o el ARNm, para las cepas de gripe B. El ARN vírico (-ARN) es extraído de viriones purificados y se analiza en geles de agarosa de formaldehído usando procedimientos estandarizados. El ADNc se sintetiza usando un sistema de cebadores universal para el ARN vírico para las cepas de gripe A, o cebadores aleatorios para el ARNm de cepas de gripe B. Se prepara más ADN complementario (ADNc) estándar usando un cebador de oligonucleótido universal (5'-AGCAAAGCAGG-3' (SEC ID N°: 1)) que es homólogo a todos los segmentos de ARN de hemaglutinina en los virus de gripe A y B (Davis y col., "Construction and characterization of a bacterial clone containing the hemagglutinin gene of the WSN strain (H0N1) of influenza virus" *Gene*, 10: 205-218 (1980)). Los cebadores se diseñan homólogos a regiones conservadas en los extremos 5' y 3' de los genes de hemaglutinina de gripe. Ambos cebadores 5' y 3' también presentan sitios enzimáticos de restricción en los extremos que no se dan en los genes de hemaglutinina.

Se mezclan los cebadores de gripe A o B y el ADNc de gripe apropiados y se amplifican los segmentos de gen de hemaglutinina usando procedimientos de PCR estándares. Los fragmentos de ADN de cadena doble resultantes contienen secuencias codificadoras de hemaglutinina madura completas. Se usa la reacción en cadena de polimerasa ("PCR") para amplificar el gen de HA total, que a continuación es clonado en un hospedante bacteriano adecuado tal como *E. coli*. Los extremos 5' son secuenciados para identificar el péptido señal de los genes de HA, a

continuación se usa PCR para amplificar los genes de HA menos el péptido señal. A continuación éste es subclonado en un vector de transferencia de plásmido que contiene el promotor de polihedrina AcNPV. Los vectores de transferencia resultantes contienen las siguientes secuencias 5' -> 3': promotor de polihedrina del baculovirus *A. californica* NPV, un codón de inicio de la traducción ATG, un péptido señal de baculovirus de 61K, las secuencias codificadoras para la hemaglutinina madura, el codón de terminación de la traducción de hemaglutinina natural, la señal de poliadenilación de ARN de polihedrina y ADN flanqueante de baculovirus.

Entonces se mezcla un ADN de plásmido de transferencia quimérico purificado que contiene un gen de hemaglutinina con ADN de AcNPV natural, se co-precipita con calcio y se transfecta en células de *S. frugiperda*. Se seleccionan baculovirus recombinantes en base a la morfología de placa y se purifican mediante rondas adicionales de purificación de placa. Los baculovirus recombinantes clonados son escrutados en relación a la expresión de hemaglutinina y se selecciona un vector de expresión de baculovirus único para producir un Banco de Virus Maestro.

Cepas de gripe A:

Los genes de HA procedente de cepas de gripe A son clonados a partir de preparaciones de ARN vírico purificadas. El ARN vírico se extrae de 100-200 microlitros de viriones de gripe A purificados que contienen 1.000-2.000 unidades de hemaglutinina (UHA) de gripe. Una UHA es la cantidad de virus que aglutina el 50% de las células sanguíneas rojas en el ensayo estándar de aglutinación (Rosen, 1969). Los viriones son tratados con proteinasa K para digerir la proteína, a continuación el ARN vírico es extraído con volúmenes iguales de fenol y cloroformo, y es precipitado con etanol en presencia de vehículo de ARNt. El ARN vírico se vuelve a suspender en tampón y se digiere con ADNasa libre de ARNasa para eliminar cualquier ADN contaminante, después se repiten las etapas de extracción y precipitación. A continuación se analiza el ARN vírico (ARNv) usando geles de agarosa de formaldehído, tal como se describe en Maniatis y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" pág. 86-96 y 366-367 (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring, N.Y. 1982).

Cepas de gripe B:

Los genes de HA procedentes de cepas de gripe B son clonados a partir de ARN mensajero (ARNm) total extraído de células infectadas con la cepa de gripe B. A continuación el ARN total es extraído de las células infectadas. Las células recolectadas son lisadas en presencia de tiocianato de guanidinio y el ARN celular total es purificado usando, por ejemplo, el kit de extracción de ARN de Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ). El ARNm total es extraído a partir de ARN celular usando columnas de giro de oligo-(dT)-celulosa usando, por ejemplo, el kit de purificación de ARNm de Pharmacia Biotech Inc.

Expresión y procesado de hemaglutinina recombinante en células de insecto

Los antígenos de hemaglutinina recombinante se expresan en niveles elevados en células de *S. frugiperda* infectadas con vectores de hemaglutinina de AcNPV. El producto génico primario es hemaglutinina (rHA0) de longitud completa sin procesar y no es secretado, sino que permanece asociado a membranas periféricas de células infectadas. Este HA0 recombinante es una proteína con un peso molecular de 68.000 que está glicosilada con glicanos de tipo manosa superior ligados mediante N distintos de los glicanos producidos por la expresión de las proteínas víricas en células de mamífero o de ave. Existen evidencias de que la rHA0 forma trímeros post-traducción que se acumulan en las membranas citoplásmicas.

Vectores para la expresión de HA0 y otras proteínas

La HA0 es una vacuna mejor debido a su estabilidad superior en comparación con el complejo HA1/HA2, y mantiene un plegamiento correcto durante la purificación y el almacenamiento. La estabilidad superior es particularmente evidente en las cepas B, dando como resultado títulos que son aproximadamente cinco veces más altos que los obtenidos con cepas B atenuadas disponibles comercialmente.

Tal como se describe más adelante en los ejemplos, cuando los genes de HA fueron clonados en pMGS12 a través de sitios de restricción, el péptido señal maduro de HA fue eliminado y reemplazado con el péptido señal de quinitasa de baculovirus, denominado péptido señal de 61 kD. Puesto que el gen de HA está conectado al péptido señal a través de un sitio de ruptura, existen entre tres y cinco aminoácidos, dependiendo del sitio de restricción seleccionado, entre la proteína HA0 madura y el péptido señal de 61 kD. Aunque no es un problema con las cepas A de la gripe, la cepa B HA0 expresada con los aminoácidos adicionales no se pliega de la forma apropiada.

Se desarrollaron dos vías para solventar este problema. La primera es el uso de un nuevo vector, pMGS3, que no codifica el péptido señal de 61 kD. La HA0 con su péptido señal nativo es clonada en el vector y es expresada. Una vez caracterizada mediante SDS-PAGE, la HA0 de cepa B expresada en dicho vector muestra una mejor glicosilación y un mejor procesado que cuando se expresa en pMGS12. La HA0 se plegó tan bien que puede convertirse cuantitativamente en HA1/HA2. Desafortunadamente, según se determinó mediante análisis de transferencia Western, el rendimiento no es muy elevado. El segundo método aumenta el rendimiento usando el péptido señal de 61 kD en pMGS12 para guiar la expresión donde el gen de HA0 fue insertado sin el uso de enzimas de restricción. El nuevo vector, que incluye el péptido señal de 61 kD y el gen de HA0, sin aminoácidos intervinientes

extraños que codifiquen una secuencia, recibe la designación pMGS27.

El pMGS27 puede usarse para clonación y expresión de cualquier gen en un sistema de expresión de baculovirus. El gen diana, en lugar de ser clonado en el vector mediante restricción y ligación, es clonado en el vector mediante maduración. Los reactivos se encuentran disponibles en Clontech en su sistema de clonación PCR-direct. El pMGS27 fue diseñado de tal modo que se puede linealizar en el extremo de la región codificadora de péptido señal de quitinasa, y se pueden crear dos colas de cadena sencilla largas mediante tratamiento del pMGS27 linealizado con ADN polimerasa T4 más dATP.

El gen diana es amplificado usando reacción en cadena de polimerasa ("PCR") o PCR de transcriptasa inversa ("RT-PCR") con un par de oligonucleótidos diseñados para crear colas de cadena sencilla que sean complementarias a las colas del pMGS27 tratado, después de que el fragmento de PCR haya sido tratado con ADN polimerasa T4 y dTTP. A continuación una simple maduración puede combinar las dos moléculas en un plásmido circular que está preparado para transformar el hospedante. Además de ser más rápido y sencillo que el método tradicional de restricción-ligación para la clonación de un gen de HA en pMGS12, el pMGS27 presenta la importante ventaja de que no produce aminoácidos extra codificados por los sitios de restricción creados entre el péptido señal de quitinasa y la proteína HA madura. Estos aminoácidos extra a veces pueden originar dificultades tales como que la peptidasa señal no se pliegue correctamente, como en el caso de la HA de cepa B.

Purificación de HA0 recombinante

Varios días después de la infección la rHA0 se puede extraer selectivamente de las membranas periféricas de células infectadas con hemaglutinina de AcNPV empleando un detergente no iónico no desnaturizante u otros métodos conocidos por los especialistas en la técnica para la purificación de proteínas recombinantes procedentes de células de insecto, que incluyen, aunque sin limitación, cromatografía de afinidad o de gel y unión de anticuerpos. La rHA0 soluble en detergente puede ser purificada adicionalmente usando intercambio iónico de DEAE y cromatografía de afinidad de lentil lecitina, u otros métodos equivalentes conocidos por los especialistas en la técnica.

En una realización preferida, la rHA0 se purifica usando un procedimiento que es más suave y que da como resultado una mayor producción de rHA0 a partir de cepas B de gripe. Este procedimiento generalmente es como se indica a continuación:

La proteína HA0 que forma una parte integral de la membrana de las células de insecto es separada de las proteínas solubles, de las proteínas de membrana periférica y de la mayoría del ADN y ARN mediante extracción de las células en una disolución alcalina relativamente viscosa, en donde un pH alcalino se define para un valor entre 9,5 y 10,5. La viscosidad aumenta a través de la inclusión de sacarosa en una concentración aproximadamente 250 mM. Se incluye un agente reductor de disulfuro, por ejemplo β -mercaptoetanol, en una concentración eficaz para prevenir enlaces de disulfuro entre las proteínas de la mezcla. Las células se vuelven a suspender en el tampón de extracción, se homogeneizan y a continuación se centrifugan. La partícula se lava mediante homogeneización en un tampón de baja fuerza iónica que contenga un agente reductor de disulfuro a un pH alcalino (la conductividad generalmente es inferior a 1 mS, pH 10,5) y la partícula se centrifuga. Entonces se extrae la HA0 de la partícula en un tampón que contiene entre 0,3 y 1,5% de un detergente tal como Triton, una cantidad de agente de desagregación para prevenir la formación de complejos por interacciones de carga, tal como entre 0,3 y 1,0 M de betaína o paurina, a un pH alcalino (9,5 es el preferido). La HA0 del sobrenadante es purificada a continuación mediante cromatografía de intercambio aniónico, seguida de cromatografía de intercambio catiónico. La HA0 se aplica a la columna de intercambio aniónico, por ejemplo, DEAE o Q-Sepharose® (una columna de esferas de agarosa con grupos amino cuaternarios), en el mismo tampón de la extracción pero diluido al menos 1:2 con tampón adicional, tras equilibrar la columna en tampón que contiene aproximadamente 1/10^o de la concentración de detergente y agente reductor de disulfuro. A continuación la HA0 es eluida disminuyendo el pH hasta aproximadamente 8,5. La HA0 eluida se aplica a una columna de intercambio catiónico en esencialmente el mismo tampón. Los contaminantes son eluidos disminuyendo el pH hasta aproximadamente 7,4, eluyendo después la HA0 mediante un aumento de la concentración salina hasta 0,15 M de NaCl.

Este método preferido para la purificación se describe en detalle como se indica a continuación.

Preparación de la fracción de membrana que contiene HA recombinante. Se suspenden células que expresan HA recombinante (6,2 g de células procedentes de 0,34 L de cultivo) a una concentración de 100 mg/mL en una disolución enfriada en hielo de pirofosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 100 mM, sacarosa 250 mM, 0,1% de β -mercaptoetanol, pH 10,5. Las células son alteradas mediante disrupción en un homogeneizador Polytron® (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) fijado en 4 durante 2 minutos. Se necesita un pH alcalino del medio de homogeneización para aumentar la solubilidad de las proteínas contaminantes y para aumentar la pureza de la preparación de membrana. El homogenato se centrifuga durante 30 minutos a 9.200 g. El sobrenadante se descarta y se recolecta la partícula. La preparación de la fracción de membrana viene seguida de una etapa de lavado de baja fuerza iónica. Se vuelve a suspender la partícula hasta el volumen original en la disolución enfriada en hielo de β -mercaptoetanol al 0,1%, 10,5, y se homogeneiza usando un homogeneizador Polytron® fijado en 4 durante 2 minutos. El homogenato se centrifuga durante 30 minutos a 9.200 g. El sobrenadante se descarta y la partícula es

recolectada. El lavado de baja fuerza iónica elimina la porción adicional de proteínas de membrana periférica. La preparación de la fracción de membrana da como resultado un considerable enriquecimiento en HA recombinante, y de la eliminación de ácidos nucleicos contaminantes.

5 **Extracción de la HA recombinante.** La HA recombinante se extrae entonces de forma selectiva de la partícula de membrana en unas condiciones que no desnaturalicen el antígeno. La partícula de membrana se homogeneiza en 41 mL de una disolución enfiada en hielo de etanolamina 10 mM, pH 9,5, Triton N101 al 1%, β -mercaptoetanol al 0,1%, NaCl 25 mM, betaína 400 mM usando un homogeneizador Polytron fijado en 4 durante 2 minutos. Tras una incubación de 40 minutos a 23°C la mezcla se centrifuga durante 30 minutos a 9.200 g. El sobrenadante que contiene HA recombinante se decanta y se diluye a la mitad con el mismo tampón.

10 Se analizan las proteínas mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. Las muestras son sometidas a disrupción en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) al 2% y un 5% de β -mercaptoetanol, a continuación se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% en presencia de un 0,1% de SDS, y entonces se tiñen con azul de Coomassie.

15 **Purificación cromatográfica.** La purificación cromatográfica de la HA recombinante se simplificó y se eliminó la cara cromatografía de afinidad sobre Lentil Lectina Sepharose del proceso, sustituyéndola por un proceso de purificación cromatográfica en dos etapas que da como resultado un antígeno de HA recombinante altamente purificado que no está desnaturalizado y que es adecuado como componente de una vacuna contra la gripe de uso humano. Las matrices de gel de cromatografía usadas son Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow® y CM-Sepharose Fast Flow®.

20 **Cromatografía de intercambio aniónico.** Todas las cromatografías se llevan a cabo a temperatura ambiente. El extracto que contiene HA recombinante preparado como se ha descrito anteriormente es aplicado con un caudal de 1 mL/min a Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow® (5 mL en una columna Pharmacia C10/10) equilibrada con etanolamina 10 mM pH 9,5, Triton® N101 al 0,1%, β -mercaptoetanol al 0,01%, NaCl 25 mM y betaína 400 mM. A continuación la columna se lava con el tampón de equilibrado hasta que la absorbancia de UV del efluente vuelve a la línea base. En estas condiciones la HA recombinante se une a la columna a la vez que parte de los contaminantes son arrastrados. A continuación la HA recombinante parcialmente purificada es eluida con dietanolamina 30 mM pH 8,5, Triton® N101 al 0,1%, β -mercaptoetanol al 0,01%, NaCl 25 mM y betaína 400 mM.

25 **Cromatografía de intercambio catiónico.** El eluato de Q-Sepharose (23 mL) se diluye a la mitad con dietanolamina 30 mM pH 8,5, Triton® N101 al 0,1%, β -mercaptoetanol al 0,01%, NaCl 10 mM y betaína 400 mM. Entonces la columna es lavada con 35 mL de fosfato sódico 10 mM pH 7,4, Triton® N101 al 0,1%, β -mercaptoetanol al 0,01%, NaCl 10 mM y betaína 400 mM. Este tratamiento eluye los contaminantes de la columna a la vez que la HA recombinante permanece ligada a la CM Sepharose. A continuación se elimina el detergente mediante lavado de la columna con fosfato sódico 10 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, hasta que la absorbancia de UV del efluente retorna a la línea base. La HA recombinante purificada es eluida con disolución salina de tampón de fosfato, pH 7,5 (PBS).

30 La rHA0 purificada se vuelve a suspender en una disolución tamponada isotónica. Después de la eliminación del detergente, la rHA0 purificada aglutinará de forma eficiente células sanguíneas rojas.

Propiedades estructurales y biológicas de la HA0 recombinante

35 La rHA0 se purifica hasta al menos un 95% de pureza, más preferiblemente un 99% de pureza. Ésta migra predominantemente como un único polipéptido principal de 68.000 de peso molecular en gel de poliacrilamida-SDS. La estructura cuaternaria del antígeno de HA0 recombinante purificado se examinó mediante microscopía electrónica, resistencia a tripsina, análisis de sedimentación de densidad y capacidad para aglutinar células sanguíneas rojas. Estos datos demuestran que la HA0 recombinante forma trímeros, que se unen en rosetas.

40 La rHA0 purificada no aglutina células antes de la eliminación del detergente, lo que sugiere que el antígeno debe de formar complejos (rosetas) con el objetivo de reticular células sanguíneas rojas de pollo. La capacidad cuantitativa de la rHA0 purificada para aglutinar células se usa como medida de la consistencia del antígeno lote-a-lote. Se define una unidad de hemaglutinina como la cantidad de antígeno requerida para alcanzar un 50% de aglutinación en un ensayo estándar de hemaglutinina con células sanguíneas rojas de pollo. Los datos comparativos muestran que los antígenos de rHA0 purificada aglutinan células sanguíneas rojas con una eficacia comparable a la observada en los viriones de gripe completos.

45 La HA0 recombinante puede ser separada en el enlace de disulfuro, causando un cambio conformacional que da como resultado la formación de dos cadenas, HA1 y HA2, tal como describen Carr, C.M. y Kim, P.S., "A Spring-loaded Mechanism for the Conformational Change of Influenza Hemagglutinin", *Cell* 73: 823-832 (1993). La separación de HA0 recombinante se describe con más detalle a continuación en el Ejemplo 6. Se cree que tras la separación de HA0 natural en HA1 y HA2, las cadenas se vuelven infecciosas adquiriendo la capacidad de fusionarse con una célula, creando con ello una respuesta inmune mejorada. El procesado de antígenos tales como la hemaglutina de gripe se produce mediante la unión de péptidos antigénicos a moléculas de histocompatibilidad primarias (MHC). El complejo antígeno/MHC es reconocido por células T para iniciar una respuesta inmune, tal como se describe en la

revisión de Harding y Geuze, *Current Opinion in Cell Biology* 5: 596-605 (1993), que es incorporada a la presente memoria a modo de referencia. La rHA0 producida en un baculovirus, sin embargo, es altamente estable e inmunogénica como la molécula intacta. La comparación de las moléculas de azúcar con la HA0 expresada en células de insecto muestra que los glicanos son diferentes de los que se dan cuando la HA0 se expresa en células de mamífero o de ave.

Producción de proteínas de fusión

Se pueden preparar proteínas de fusión que consisten en la HA0 fusionada a una segunda proteína antigénica, en donde la antigenicidad de la segunda proteína es baja o existen ventajas para estimular una respuesta inmunogénica a antígenos múltiples. Un ejemplo de un segundo antígeno preferido es la neuraminidasa producida por la gripe. El antígeno puede consistir en una proteína celular, vírica o bacteriana, o una porción antigénica de la misma que incluye al menos de cinco a ocho aminoácidos. Otros antígenos incluyen el antígeno de la hepatitis B, antígenos del VIH y antígeno carcinoembrionario. Una "respuesta inmune", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una respuesta humoral, medida mediante la producción de anticuerpos del antígeno, o a una respuesta celular, medida mediante la estimulación de una respuesta mediada por células T al antígeno. En algunos casos se puede insertar un "ligando" de aminoácidos no antigénicos entre la HA y el antígeno, para potenciar aún más la antigenicidad del antígeno con respecto a la HA. El proceso implica construir un plásmido de ADN para fusionar genes antígenos diana al gen de longitud completa de HA de virus de la gripe, o a fragmentos del mismo, usando metodología de sondas de oligonucleótido y de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Los genes de fusión de antígeno diana-HA son modificados para obtener una expresión apropiada en células de insecto mediante la eliminación de la secuencia natural de péptido señal hidrofóbico y sustitución con un nuevo péptido señal de baculovirus. El gen de fusión se introduce en un vector de expresión de baculovirus de tal modo que el promotor de polihedro de baculovirus dirige la transcripción de las proteínas de fusión en células de insecto infectadas. El péptido señal de baculovirus de 18 aminoácidos dirige la traducción del polipéptido de fusión de antígeno diana-HA en el mecanismo de glicosilación de célula de insecto, y no está presente en la proteína de fusión madura.

Por ejemplo, el Plásmido pA9440, que contiene el gen de HA de la cepa A/Pekín/32/92 en el plásmido de transferencia de baculovirus pMGS12 descrito más adelante, se usó como plantilla para la amplificación del gen de HA mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando el protocolo recomendado por el suministrador (kit de clonación Gene Amp PCR, Perkin Elmer Cetus). La mezcla de reacción de PCR (100 μ L) contenía 20 pmol de cebadores diseñados para madurarse con porciones del gen de HA. Los cebadores 5' y 3' fueron diseñados con sitios de endonucleasa de restricción en los extremos, que no se encuentran en el gen de HA. El cebador de PCR 5' (0-567) para los fragmentos HA0 y HA1 comienza 52 pares base por debajo del extremo 5' de las secuencias codificadoras de gen de HA naturales, eliminando la secuencia de péptido señal natural y añadiendo un sitio *Sma*I inmediatamente en dirección 5' respecto a las secuencias codificadoras de HA. El cebador de PCR 5' (0-651) para el fragmento HA2 comienza en el nucleótido 1108 del gen de HA natural, inmediatamente después del codón que codifica el residuo de arginina que es eliminado durante la separación de HA0 en HA1 y HA2. El cebador PCR 3' (0-680) para los fragmentos HA0 y HA2 se diseñó para añadir un sitio *Kpn*I inmediatamente después de las secuencias codificadoras de HA, eliminando el codón de parada natural. El cebador PCR 3' para HA1 (0-679) trunca el gen inmediatamente antes del residuo de arginina eliminado durante la separación de HA0. La amplificación del fragmento de gen de HA se llevó a cabo durante 30 ciclos de 1 minuto a 94°C para la desnaturalización, 2 minutos a 55°C para la maduración con los cebadores, y 2 minutos a 72°C para la extensión. Los fragmentos de gen de HA amplificados resultantes se sometieron a electroforesis sobre geles de agarosa, se purificaron a partir del gel usando un kit GeneClean (Bio 101, Inc.), y se ligaron en un plásmido diseñado para aceptar fragmentos generados por PCR (pCRII; Invitrogen). De este modo se obtuvieron los plásmidos pB142, pB144 y pB330, que contienen los fragmentos génicos de HA0, HA1 o HA2, respectivamente.

Los fragmentos génicos de HA se eliminaron de los plásmidos pB142, pB144 y pB330 con enzimas de restricción *Sma*I y *Kpn*I y a continuación se subclonaron mediante técnicas de ADN recombinante estándares (Sambrook y col., 1989) en el plásmido de transferencia de AcNPV pMGS12. El plásmido pMGS12 contiene, de 5' a 3', el promotor de polihedro de AcNPV, un codón de inicio ATG, la secuencia para un péptido señal de separación procedente de una glicoproteína de baculovirus con un peso molecular de 61.000 (61K), sitios de clonación de enzima de restricción *Sma*I y *Kpn*I, y una secuencia de codón de parada universal TAA. Flanqueando estas regiones reguladoras está el ADN procedente del fragmento de *Eco*RI I procedente del genoma de AcNPV (Summers y Smith, "A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures". Texas Agricultural Experimental Station Bulletin N° 1555 (1987)). Los fragmentos de PCR de HA clonada fueron escindidos del vector de clonación pCRII con *Sma*I y *Kpn*I, purificados mediante electroforesis de gel de agarosa y el kit GeneClean, y ligados en pMGS12 que también había sido digerido con *Sma*I y *Kpn*I. Los plásmidos de transferencia de AcNPV resultantes, pB879, pB1201 y pB1205 contenían las regiones codificadoras para HA0, HA1 o HA2, respectivamente, ligados en estructura con el péptido señal de baculovirus separable procedente del gen de 61K y el promotor de polihedro. Los plásmidos de transferencia de AcNPV pB879, pB1201 y pB1205 pueden usarse para fusionar HA0, HA1 o HA2 a cualquier gen de interés.

La segunda etapa de la construcción de plásmidos de transferencia de gen de fusión HA-CEA fue insertar las secuencias codificadoras de CEA en las construcciones que codifican HA. Los sitios de reconocimiento/separación de endonucleasa de restricción para *Sma*I y *Kpn*I fueron colocados a ambos extremos del gen CEA mediante amplificación PCR del plásmido pA9080. El cebador PCR 5', 0-649, comienza a 82 pares base del extremo 5' del gen, eliminando la secuencia de péptido señal natural de CEA. El cebador PCR 3', 0-650, se diseñó para eliminar los últimos 72 pares base del extremo 3' del gen que codifica para la secuencia de región C-terminal hidrofóbica. La amplificación del fragmento génico CEA se llevó a cabo durante 30 ciclos de 1 minuto a 94°C para la desnaturalización, 2 minutos a 55°C para la re-maduración y 2 minutos a 72°C para la extensión. El fragmento génico de CEA amplificado resultante se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa, se purificó con el procedimiento GeneClean y se ligó en pCRII (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El plásmido resultante, pB806, contiene el gen CEA sin su péptido señal natural, dominio hidrofóbico C-terminal o codón de parada, pero con ambos sitios *Sma*I y *Kpn*I en ambos extremos del gen.

Se llevó a cabo una preparación de plásmido a gran escala con el plásmido pB806, y se digirió el ADN con *Sma*I o con *Kpn*I. Los fragmentos codificadores de CEA se purificaron mediante electroforesis de gel de agarosa y el kit GeneClean, y los fragmentos purificados fueron ligados en cada una de las tres construcciones que codifican HA (pB879, pB1201 o pB1205) digeridas con la misma enzima de restricción. Por ejemplo, los fragmentos que codifican CEA con extremos cortados con *Sma*I fueron ligados en las construcciones que codifican HA0, HA1 y HA2 (pB879, pB1201 y pB1205, respectivamente) cortadas con *Sma*I para crear los plásmidos pB1250, pB1555 y pB1584, respectivamente. Los fragmentos que codifican CEA con extremos cortados con *Kpn*I fueron ligados en construcciones que codifican HA0, HA1 y HA2 cortadas con *Kpn*I para crear pB1264, pB1564 y pB1593. La inserción del gen CEA en el sitio *Sma*I ubicó las secuencias codificadoras de CEA por debajo de las secuencias codificadoras de HA. Para todas las construcciones, el cebador PCR se diseñó de tal modo que el gen EA se insertó en estructura con HA, y la traducción génica de fusión terminaría en la señal de terminación de la traducción universal (TAATTAATTA) (Secuencia ID N°: 4) en las secuencias de vector pMGS12 por debajo del sitio *Kpn*I.

Esta construcción puede mejorarse mediante la eliminación de aminoácidos intervinientes, tanto entre el péptido señal y HA0, tal como se describe más adelante, como entre la HA0 y el gen de fusión, para potenciar el plegamiento y la inmunogenicidad.

Formulación y empaquetamiento de vacunas

La rHA se puede formular y empaquetar sola o en combinación con otros antígenos de la gripe, usando métodos y materiales conocidos por los especialistas en la técnica para las vacunas contra la gripe. En una realización preferida, se combinan las proteínas HA procedentes de dos cepas A y de una cepa B para formar una vacuna multivalente.

En una realización particularmente preferida, las Has se combinan con un adyuvante, en una cantidad efectiva para potenciar la respuesta inmunogénica contra las proteínas HA. Actualmente, el único adyuvante usado ampliamente en humanos ha sido el alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio). La saponina y su componente purificado Quil A, el adyuvante completo de Freund y otros adyuvantes usados en investigación y aplicaciones veterinarias presentan toxicidades que limitan su uso potencial en vacunas para humanos. Sin embargo, nuevas preparaciones definidas químicamente tales como el dipéptido de muramilo, el monofosforil lípido A, conjugados de fosfolípidos tales como los descritos por Goodman-Snitkoff y col., *J. Immunol.* 147: 410-415 (1991), la encapsulación de la proteína dentro de un proteoliposoma tal como describen Miller y col., *J. Exp. Med.* 176: 1739-1744 (1992), y la encapsulación de la proteína en vesículas de lípidos tales como las vesículas lipídicas Novasome™ (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH) también deberían ser útiles.

En la realización preferida la vacuna se empaqueta en una única dosis para inmunización mediante administración parenteral (es decir, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración nasofaríngea (es decir, intranasal). La dosis efectiva se determina tal como se describe en los siguientes ejemplos. El vehículo normalmente es agua o una disolución salina tamponada, con o sin un conservante. El antígeno puede presentarse liofilizado para re-suspensión en el momento de la administración o en disolución.

El vehículo también puede ser un sistema polimérico de liberación retardada. Los polímeros sintéticos son particularmente útiles en la formulación de una vacuna para efectuar la liberación controlada de antígenos. Un ejemplo previo de esto fue la polimerización de metil metacrilato en esferas con diámetros inferiores a una micra para formar las denominadas nanopartículas, publicada por Kreuter, J., *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology*, M. Donbrow (Ed.). CRC Press, páginas 125-148. La respuesta de anticuerpos, así como la protección contra la infección, con el virus de la gripe resultó ser significativamente mejor que cuando el antígeno se administra en combinación con hidróxido de aluminio. Experimentos con otras partículas han demostrado que el efecto de adyuvante de estos polímeros depende del tamaño de partícula y de la hidrofobicidad.

Se ha aplicado la microencapsulación a la inyección de productos farmacéuticos microencapsulados para proporcionar una liberación controlada. Una serie de factores contribuyen a la selección de un polímero concreto para la microencapsulación. La reproducibilidad de la síntesis del polímero y del proceso de microencapsulación, el coste de los materiales y del proceso de microencapsulación, el perfil toxicológico, los requisitos de cinética de

liberación variable y la compatibilidad fisicoquímica del polímero y los antígenos son todos los factores que deben considerarse. Los ejemplos de polímeros útiles son policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres y poliamidas, particularmente aquellas biodegradables.

5 Una elección frecuente como vehículo para productos farmacéuticos, y más recientemente para antígenos, es el poli (d,l-lactide-co-glicólido) (PLGA). Se trata de un poliéster biodegradable que tiene una larga historia de uso médico en suturas erosionables, placas óseas y otras prótesis temporales, en donde no ha mostrado ninguna toxicidad. Una amplia variedad de productos químicos, que incluyen péptidos y antígenos, han sido formulados en microcápsulas de PLGA. Se ha acumulado mucha información sobre la adaptación de PLGA para la liberación controlada de antígenos, por ejemplo, como se muestra en la revisión de Eldridge, J.H., y col., Current Topics in Microbiology and Immunology, 1989, 146: 59-66. Se ha demostrado que el atrapamiento de antígenos en microesferas de PLGA de 1 a 10 micras de diámetro tiene un efecto adyuvante destacado cuando se administra oralmente. El proceso de microencapsulación en PLGA usa una separación de fases de una emulsión de agua en aceite. El compuesto de interés se prepara en forma de disolución acuosa y el PLGA se disuelve en disolventes orgánicos adecuados tales como cloruro de metileno y acetato de etilo. Estas dos disoluciones inmiscibles se emulsionan conjuntamente mediante agitación a alta velocidad. A continuación se añade un no disolvente del polímero, lo que provoca la precipitación del polímero alrededor de las gotas de fase acuosa para formar microcápsulas embrionarias. Las microcápsulas son recolectadas, y estabilizadas con uno entre una serie de agentes (alcohol polivinílico (PVA), gelatina, alginatos, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa) y el disolvente se elimina por secado a vacío o mediante extracción con disolvente.

20 **Ejemplo 1: Propagación y purificación de virus de la gripe**

Las siguientes cepas de vacuna contra la gripe se obtuvieron en la FDA en fluido alantoico de huevo de pollo:

25 Tipo A/Pekín/353/89 (H3N2)
 Tipo A/Pekín/32/92 (H3N2)
 Tipo A/Texas/36/91 (H1N1)
 Tipo B/Panamá/45/90

30 Para propagar el stock original de virus de la gripe obtenido de la FDA, se infectaron células MDCK en presencia de tripsina tratada con TPCK (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y concentraciones de suero bovino fetal optimizadas para producir los mayores títulos de virus de primer pasaje. Las células MDCK fueron infectadas con las cepas de gripe a una baja multiplicidad de infección (de 0,1 a 0,5), según se determina en un ensayo de HA estándar (Rosen, "Hemagglutination with Animal Viruses" en *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel y N.P. Salzman, páginas 276-28 (Academic Press, Nueva York, 1969)). Las células infectadas fueron incubadas a 33°C durante 48 h y el medio se evaluó para determinar la producción de virus usando el ensayo de actividad de hemaglutinación. Se usaron las condiciones que dan lugar a la mayor actividad de HA para preparar grandes stocks de virus de la gripe. Las concentraciones óptimas de TPCK tripsina y suero fetal bovino para los anteriores virus de la gripe se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración óptima de TPCK tripsina y suero fetal bovino.

	A/Pekín/353/89	A/Pekín/32/92	A/Texas/36/91	A/Panamá/45/90
% Suero fetal bovino	0,25 %	0,25 %	0,25 %	5,0 %
Cantidad de tripsina tratada con TPCK	45 µg/mL	45 µg/mL	45 µg/mL	3 µg/mL

40 **Purificación de virus de la gripe:** se recolectó el virus 24-48 horas después de la infección a partir de 10 matraces de cultivo de tejido T175 clarificando el medio (1.000 x g durante 10 minutos) de células MDCK infectadas con gripe. A partir del medio se obtuvo una partícula de virus a 100.000 x g durante 1 hora. La partícula vírica resultante se volvió a suspender en 1 mL de disolución salina tamponada de fosfato (PBS), pH 7,4, y se centrifugó a través de un gradiente de sacarosa en PBS de 20 mL al 20-60% (p/v). La banda de virus de la gripe se recolectó de la región de sacarosa al 40-45% del gradiente, se diluyó con PBS y se obtuvo la partícula a 100.000 x g. La partícula de virus purificada se volvió a suspender en 0,5 mL de PBS almacenado a -70°C.

45 **Ejemplo 2: Clonación de gen de HA de gripe A/Texas/36/91**

50 En la Figura 2 se muestra un ejemplo específico de la etapa de clonación para uno de los genes de HA de la gripe. Se extrajo ARN vírico tal como se ha descrito anteriormente de gripe A/Texas/36/91, obtenida del CDC. Se usó el cebador universal complementario al extremo 3' de los segmentos de ARN de gripe 5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEC ID N°: 1) con transcriptasa inversa de Virus de leucemia Maloney murino (M-MuLV) para producir ADNc's de gripe.

El ARN o ARNm vírico purificado (5 µg) se usó como plantilla para preparar ADNc utilizando transcriptasa inversa de M-MuLV suministrada en el kit First-Strand cDNA Synthesis Kit de Pharmacia Inc. El cebador usado para ADNc de ARN vírico procedente de cepas A de gripe fue un cebador de oligonucleótido sintético (5'-AGCAAAGCAGG-3') (SEC ID N°: 1), que es homólogo al extremo 3' de todos los segmentos de virión de gen de HA.

5 La amplificación de genes de HA a partir de ADNc se realizó mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando condiciones de reacción estándares (Gene Amp kits; Cetus/Perkin Elmer, Norwalk, CT). La mezcla de reacción PCR (100 µL) contenía 20 pmol de cebadores específicos para los extremos 5' y 3' del gen de HA de gripe A (H3) ó A (H1) o de las cepas B de gripe, tal como se determina mediante secuencias de consenso encontradas en los archivos de datos de ADN del GenBank, como se muestra en la Tabla 2. La amplificación se llevó a cabo durante 10 30 ciclos que consistían en 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 2 minutos a 55°C para re-maduración y 3 minutos a 72°C para extensión. Los productos PCR fueron analizados sobre geles de agarosa al 0,8% para obtener el tamaño correcto antes de la clonación.

15 En la PCR se usaron cebadores PCR desde el extremo 5' del gen de HA: 5'-GGG GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA-3' (SEC ID N°: 2) y desde el extremo 3' del gen de HA: 5'-GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEC ID N°: 3) para producir el gen de HA de longitud completa.

20 Se diseñó un nuevo cebador PCR 5' a partir del extremo 5' del gen: extremo 5' menos la secuencia señal: 5'-GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT-3' (SEC ID N°: 4) y el extremo 3' del gen: 5'-GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEC ID N°: 5). Estos fueron usados en PCR para producir el gen de HA menos la secuencia de péptido señal. A continuación éste se insertó en el vector TA separado con *KpnI*. El péptido señal de 61K para la expresión de baculovirus y el promotor de polihedrina fueron insertados a continuación en el vector TA que contiene el gen de HA menos la secuencia de péptido señal de la gripe. El vector de recombinación de baculovirus resultante contiene el promotor de polihedrina, el péptido señal de baculovirus de 61K y el gen de HA correspondiente a gripe A/Texas/36/91.

25 Los genes de HA procedentes de las cepas de gripe B fueron clonados a partir de ARN mensajero total (ARNm) extraído de células MDCK infectadas con la cepa de gripe B B/Panamá/45/90. El ARN total se preparó a partir de 5 matraces T175 de células infectadas. Las células recolectadas fueron lisadas en presencia de tiocianato de guanidinio y el ARN celular total se purificó tal como se ha descrito anteriormente. El ARNm total se extrajo del ARN celular usando columnas de giro de oligo-(dT)-celulosa, tal como se ha descrito antes.

30 El cebador usado para el ARNm procedente de las cepas de gripe B fue un cebador de ADN de oligonucleótido aleatorio (Pharmacia, Inc.).

Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación PCR.

A/Pekín/32/92	
Gen de extremo 5' (SEC ID N°: 27)	5' GGG <u>GGA TCC GGT ACC</u> AGC AAA AGC AGG GGA TAA TTC TAT 3' BamHI KpnI
Extremo 5' menos péptido señal de HA (SEC ID N°: 28)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG</u> GAC TTT CCA GGA AAT GAC AAC AG 3' KpnI SmaI
Extremo 3' (SEC ID N°: 29)	3' TAA TTA ATT TTT GTG GGA ACA AAG ATC CTA CTA <u>AGC CAT GGC</u> CC 5' KpnI

A/Texas/36/91	
Gen de extremo 5' (SEC ID N°: 2)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG</u> AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA 3' KpnI SmaI
Extremo 5' menos péptido señal de HA (SEC ID N°: 4)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG</u> GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT 3' KpnI SmaI
Extremo 3' (SEC ID N°: 3)	3' GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT <u>CCA TGG CCC</u> 5' KpnI

B/Panamá/45/90	
Gen de extremo 5' (SEC ID N°: 30)	5' GGG <u>GAA TTC GGT ACC CCC GGG</u> AAG GCA ATA ATT GTA CTA CTC ATG GT 3' EcoRI KpnI SmaI
Extremo 5' menos péptido señal de HA (SEC ID N°: 31)	5' <u>GGT ACC CCC GGG</u> GAT CGA ATC TGC ACT GGG ATA ACA 3' KpnI SmaI
Extremo 3' (SEC ID N°: 32)	3' TG TTA CAA AGA ACA/G AGG TAG ACA GAC ACT <u>CCA TGG CCT AGG CTT AAG</u> GGG 5'

	KpnI	BamHI	EcoRI
--	------	-------	-------

Un ejemplo de productos de síntesis de ADNc usó ARN vírico de virus de la gripe A/Texas/36/91 como plantilla. La localización de los segmentos de ADNc que codifican para las proteínas de la gripe podría determinarse como se indica a continuación. Se combinó ARN vírico purificado en la mezcla de reacción con el cebador de ADN de cadena sencilla universal 5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEC ID N°: 1). Este cebador es complementario al extremo 3' de los segmentos de virión de la gripe, tal como se ha descrito antes. La reacción también contenía la adición de [α -³²P] dCTP para visualizar los productos de ADNc que fueron separados sobre gel de hidrólisis alcalina al 1,5% (Maniatis y col., 1982) y expuestos a película X-OMAT-AR.

Ejemplo 3: Clonación de genes de HA en plásmidos bacterianos

Los genes de rHA amplificados mediante PCR fueron clonados en un vector de plásmido de tipo pUC usando el sistema TA Cloning System (Invitrogen, Inc.). La presencia de genes de HA verificó mediante análisis de digestión con enzima de restricción del ADN de plásmido purificado mediante procedimientos estándares (Maniatis y col., 1982). El extremo 5' de los genes de rHA fue analizado a continuación mediante secuenciación de ADN y se diseñaron nuevos cebadores para eliminar las secuencias que codifican para los péptidos señal hidrofóbicos en el extremo N de las proteínas de HA. A continuación se usaron los cebadores de oligonucleótido 5' y 3' específicos incluidos en la Tabla 2 para amplificar productos de ADNc mediante PCR y se clonaron en vectores de plásmido TA de *E. coli* (Invitrogen, Inc.) usando métodos de clonación estándares. Los clones de ADN resultantes contenían secuencias codificadoras para las HAs maduras.

Los genes de rHA procedentes de A/Texas/36/91, A/Pekín/353/89, A/Pekín/32/92 y B/Panamá/45/90 fueron subclonados empleando procedimientos estándares (Maniatis y col., 1982) en vectores de expresión de baculovirus. Los genes de HA fueron eliminados de los plásmidos de clonación TA con las enzimas de restricción apropiadas y se insertó el fragmento de ADN de HA purificado en un plásmido de recombinación de baculovirus. Los clones bacterianos resultantes fueron sometidos a escrutinio en función de la resistencia a ampicilina y a continuación se cortaron con enzimas de restricción para liberar el gen de HA insertado para confirmar su presencia. Los plásmidos de recombinación que contienen los genes de HA fueron purificados en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio (Maniatis y col., 1982). El extremo 5' de los plásmidos fue secuenciado para determinar la presencia de las señales de baculovirus correctas (promotor de polihedrina de AcNPV, señal de inicio de la traducción ATG y secuencia de péptido señal de baculovirus) y de la secuencia codificadora de HA apropiada en el marco de lectura correcto. Las secuencias de ADN en el extremo 5' de los genes de HA y que flanquean al promotor de polihedrina de AcNPV y al péptido señal de baculovirus (primeros 18 aminoácidos de cada secuencia de aminoácidos) se muestran en el LISTADO DE SECUENCIAS.

La SEC ID N°: 6 codifica la secuencia del extremo 5' del gen de HA para A/Pekín/32/92 (intervalo de secuencia 1-481). La SEC ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos correspondiente (que comienza en el codón de inicio "ATG" [nucleótido 19] de la SEC ID N°: 6). La secuencia de aminoácidos del péptido señal de 61K se establece en la SEC ID N°: 7 como los aminoácidos 1-18.

La SEC ID N°: 8 codifica la secuencia del extremo 5' del gen de HA para A/Texas/36/91 (intervalo de secuencia 1-481). La SEC ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos correspondiente (que comienza en el codón de inicio "ATG" [nucleótido 19] de la SEC ID N°: 8). La secuencia de aminoácidos del péptido señal de 61K se establece en la SEC ID N°: 9 como los aminoácidos 1-18.

La SEC ID N°: 10 codifica la secuencia del extremo 5' del gen de HA para B/Panamá/45/90 (intervalo de secuencia 1-434). La SEC ID N°: 11 es la secuencia de aminoácidos correspondiente (que comienza en el codón de inicio "ATG" [nucleótido 21] de la SEC ID N°: 10). La secuencia de aminoácidos del péptido señal de 61K se establece en la SEC ID N°: 117 como los aminoácidos 1-18.

En las SEC ID N°: 6 y 8 los nucleótidos 1-18 son el extremo 3' del promotor de polihedrina, los nucleótidos 19-72 codifican el péptido señal de 61K, y los nucleótidos del 73 al final codifican el extremo 5' del gen de HA.

En la SEC ID N°: 10 los nucleótidos 1-20 son el extremo 3' del promotor de polihedrina, los nucleótidos 21-74 codifican el péptido señal de 61K, y los nucleótidos del 75 al final codifican el extremo 5' del gen de HA.

Ejemplo 4: Expresión de HA recombinante en células de insecto

Los plásmidos de recombinación química que contienen los genes de HA clonados fueron purificados y se mezclaron 2 μ g con 1 μ g de ADN natural de AcNPV. Los ADNs fueron co-precipitados con calcio y transfectados en células de *S. frugiperda* usando procedimientos estándares (Smith, Summers y Frase, *Mol. and Cell. Biol.* 3: 2156-2165 (1983)). Los baculovirus recombinantes fueron identificados en base a la morfología de placa, a continuación se purificaron mediante rondas adicionales de purificación en placa. Los baculovirus recombinantes purificados en placa son sometidos a escrutinio en función de la expresión de rHA, y se selecciona un único vector de expresión de baculovirus para desarrollo posterior.

Las células de *S. frugiperda* fueron infectadas con un vector de baculovirus que contiene el gen de HA procedente de la cepa de gripe B/Panamá/45/90. A las 24, 48 y 72 horas después de la infección, se pulsaron 1×10^6 células con 25 μCi de [^{35}S]-metionina durante 15 minutos para marcar las proteínas que están siendo sintetizadas. Las células fueron recolectadas y las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida al 11% en presencia de SDS al 0,1%. Las proteínas radiomarcadas fueron detectadas mediante exposición a película X-OMAT-AR. La localización de patrones de proteínas y su tamaño en kilodaltons (kd) indicó que la proteína de HA recombinante de 85 kd es una de las proteínas principales que se sintetiza en las células a las 48 horas y a las 72 horas después de la infección.

Ejemplo 5: Producción y purificación de HA recombinante

El vector de expresión de baculovirus A8611, que contiene el gen correspondiente a gripe A/Pekín/353/89, producido esencialmente como se ha descrito anteriormente para la hemaglutinina de A/Pekín/32/92 bajo el control del promotor de polihedrina, se usó para infectar células de *S. frugiperda*. Las células fueron cultivadas a 27°C hasta una densidad de 1×10^6 células/mL en medio TNMFH (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, e infectadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 con el baculovirus recombinante A8611. Durante la infección, la hemaglutinina de gripe A/Pekín/353/89 se produce bajo el control transcripcional del promotor de polihedrina de baculovirus. Las células se recolectan 72 horas después de la infección mediante centrifugación durante 15 minutos a $3.400 \times g$, y se lavan mediante re-suspensión en medio de TNMFH libre de suero seguido de centrifugación durante 30 minutos a $10.400 \times g$. El sobrenadante se decanta y las partículas de células infectadas se almacenan a -70°C.

Se desarrolló un proceso en el que la HA recombinante se extrae selectivamente de las células infectadas en condiciones que no desnaturalizan el antígeno. A menos que se indique lo contrario, todas las etapas de extracción se llevan a cabo a 4°C. La partícula de células procedente de 0,5 L de cultivo (aproximadamente 5×10^8 células) se sometió a disrupción durante 2 minutos en 40 mL de una disolución enfriada en hielo de Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, LiCl 25 mM, Tween-20 al 1% (v/v), 1 mg/mL de leupeptina, usando un homogeneizador Polytron® (Brinkmann Instruments Inc., Westbury, NY). El homogenato se centrifugó durante 30 minutos a $9.200 \times g$. El sobrenadante se descartó y se recolectó la partícula. Esta etapa elimina proteínas de membrana solubles y periféricas de las células de insecto sin extracción de proteínas de membrana integrales como la rHA. Para extraer la rHA, la partícula se homogeneizó durante 2 minutos a un valor de 4 en 40 mL de una disolución enfriada en hielo de Tris 30 mM, etanolamina 10 mM, pH 11, LiCl 25 mM, Tween-20 al 2%. Tras una incubación de 60 minutos en hielo, el pH del homogenato se ajustó a 8,4 con HCl 1 N, y se eliminó el material insoluble mediante centrifugación durante 30 minutos a $9.200 \times g$. El sobrenadante que contenía la rHA soluble se decantó, y se comprobó el pH y, si era necesario, se ajustó a 8,4 a temperatura ambiente. La materia insoluble se volvió a suspender en 40 mL de agua para su análisis. La proteína de membrana integral de HA se solubilizó en condiciones de pH elevado, en condiciones de detergente Tween-20 y permanece en disolución después de que el pH disminuya.

Se analizaron las proteínas mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. Las muestras fueron sometidas a disrupción en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) al 2% y beta-mercaptoetanol al 5%, a continuación se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% en presencia de SDS al 0,1%, y a continuación se tiñeron con azul de Coomassie.

Se desarrolló un proceso de purificación cromatográfico para purificar la HA recombinante que dio como resultado en un antígeno de HA recombinante altamente purificado que no está desnaturalizado y que es adecuado como componente de una vacuna contra la gripe para uso humano. Se usó el siguiente procedimiento para purificar la HA de A/Pekín/353/89 procedente de células de *S. frugiperda* infectadas con el virus recombinante A8611.

Las matrices de gel de cromatografía usadas para purificar la HA a partir de 0,5 L de células de *S. frugiperda* infectadas fueron 30 mL de Pharmacia DEAE Sepharose Fast Flow (en una columna Pharmacia C16/20) y 4 mL de Pharmacia Lentil Lectina Sepharose 4B (en una columna Pharmacia C10/10). La salida de la columna de DEAE se conecta a la entrada de la columna de lentil lectina, y se aplica a las columnas acopladas el extracto celular S/N 2 preparado como se ha descrito anteriormente con un caudal de 1 mL/minuto. Las columnas fueron lavadas con Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, LiCl 25 mM, Tween-20 al 0,5%, hasta que la absorción UV a 280 nm del efluente de lentil lectina retorna a la línea base. En estas condiciones la mayoría de las proteínas contaminantes se unen a DEAE, pero la HA recombinante fluye a través de la columna. Los contaminantes restantes pasan a través de la columna de lectina y la rHA glicosilada se une a la matriz de afinidad de lentil lectina. La columna de DEAE se desconecta y la columna de lectina se lava con otros 40 mL de Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, LiCl 25 mM, Tween-20 al 0,5%. A continuación, la columna de lectina se lava con 40 mL de Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, LiCl 25 mM, desoxicolato (DOC) sódico al 0,4% (v/v). Esta etapa reemplaza el detergente Tween-20 con un detergente como el DOC que puede eliminarse de la proteína mediante diálisis. A continuación la HA recombinante se eluye de la columna de lectina con aproximadamente 20 mL de Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, LiCl 25 mM, desoxicolato sódico al 0,4% (v/v) que contiene α -D-metil manósido 0,3 M. Los resultados se analizan mediante PAGE al 11%.

Debido a la variabilidad genética de las proteínas de HA de la gripe, los detalles del anterior proceso de purificación pueden variar con cada proteína de HA recombinante única. Por ejemplo, la rHA puede unirse a la columna de intercambio iónico de DEAE en lugar de pasar con el flujo. Si esto se produce, la rHA se eliminaría de la columna de

DEAE mediante lavado de la misma con un tampón que contenga una concentración mayor de LiCl, NaCl, u otras sales.

5 Para eliminar el detergente DOC y otros componentes del tampón, el eluato de la columna de lectina que contiene la rHA purificada se sometió a diálisis frente a disolución salina tamponada de fosfato, pH 7,5 (PBS). La HA recombinante purificada tenía una pureza de al menos el 95%, determinada mediante análisis en geles de poliacrilamida SDS.

Ejemplo 6: Análisis de resistencia a rHA proteasa

10 La HA madura se agrupa en estructuras triméricas que son resistentes a una serie de proteasas, que incluyen la tripsina, que degradan los monómeros de HA (Murphy y Webster, 1990). Por lo tanto se puede usar el tratamiento de resistencia a tripsina como ensayo para la formación de trímeros funcionales. Se usó el siguiente procedimiento para estudiar la resistencia de la rHA frente al tratamiento con proteasa.

15 Se incubaron dos alícuotas de rHA purificada (A/Pekín/353/89) a 60 µg/mL sobre hielo durante 30 minutos en Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, NaCl 150 mM, en presencia y en ausencia de 50 µg/mL de tripsina tratada con TPCK. La reacción se detuvo mediante la adición de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 57,4 mM en isopropanol hasta una concentración final de 1 mM. Se desnaturalizaron alícuotas de cada muestra hirviendo en SDS al 3% en condiciones reductoras, se sometieron a electroforesis sobre geles de poliacrilamida al 11,5%, y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa usando procedimientos de tinción Western estándares. Los polipéptidos de HA fueron detectados usando suero anti-HA de cobaya preparado contra rHA purificada y un conjugado de fosfatasa alcalina de IgG anti-cobaya de cabra.

20 La rHA no tratada migra al tamaño de la HA precursora (HA0). El tratamiento con proteasa da como resultado dos bandas principales que migran a los tamaños predichos para la hemaglutinina HA1 y HA2 de la gripe. Los resultados muestran que la tripsina separa la proteína de rHA una vez para producir dos polipéptidos que son los tamaños predichos para la HA1 y la HA2. No se produce ningún otro procesado proteolítico. Estos resultados demuestran que la rHA purificada mediante el anterior proceso es resistente a la degradación mediante proteasa. Esta propiedad es
25 consistente con que la rHA purificada se encuentre en forma de trímeros.

Ejemplo 7: Inmunogenicidad de rHA usando el Ensayo de potencia de ratón estandarizado

30 Una estrategia para medir la inmunogenicidad de un antígeno es determinar la cantidad necesaria para inducir una respuesta a anticuerpo detectable en ratones (ensayo de potencia de ratón). Se usa un ensayo de potencia de ratón estandarizado para medir la inmunogenicidad de la vacuna de rHA0. Se inmunizan grupos de 5-10 ratones una vez con vacuna que contiene diluciones en serie de rHA, es decir, 0,500 µg, 0,1 µg, 0,02 µg y 0,004 µg de rHA purificada. Se recolectan los sueros 28 días después de la inmunización y se miden los anticuerpos contra antígeno de rHA en un ensayo inmunológico en fase sólida de enzima ligada estándar (ELISA) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Un ratón se ha seroconvertido si la DO450 a una dilución 1:100 del antisuero del día 28 es superior a tres desviaciones estándar por encima de la media de la DO450 de sueros pre-inmunes de ratón. La dosis efectiva
35 de vacuna necesaria para seroconvertir el 50% de los ratones (DE₅₀) es una medida de la inmunogenicidad del antígeno.

40 Por ejemplo, se inmunizan cuatro grupos de 10 ratones una vez con 0,1 g, 0,02 µg, 0,004 µg ó 0,0008 µg (diluciones 1 a 5) de vacuna de rHA0. Los sueros se recolectan 28 días después de la inmunización y se miden contra cada antígeno de rHA0 de la vacuna para seroconversión en un ensayo ELISA. Se calcula la dosis necesaria para seroconvertir el 50% de los ratones (DE₅₀) y se establece una DE₅₀ mínima para cada antígeno de rHA0.

Los datos preliminares muestran que una única dosis de 0,004 µg de rHA0 seroconvertirá al menos el 50% de los ratones.

Ejemplo 8: Administración de rHA en combinación con un adyuvante y comparación con las vacunas contra la gripe disponibles

45 La potencia de ratón de la rHA purificada procedente de gripe A/Pekín/353/89 se evaluó con alumbre o sin alumbre (pura) y se comparó con una vacuna contra la gripe comercial, FLUZONE® (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) que contiene la cepa A/Pekín/353/89 de la gripe. La vacuna se administró en una dosis de 0,5 µg, 0,1 µg, 0,02 µg y 0,04 µg. Los ratones fueron sometidos en el día 28 a las dosis de rHA purificada descritas antes. En el día 42 se recolectaron los sueros y se valoraron en un ensayo ELISA para anticuerpos IgG anti-HA.

50 Los resultados se muestran en la Figura 3. En ausencia de adyuvante sólo una dosis de 0,5 µg indujo la producción de un título de anticuerpos significativo (200.000). En presencia de adyuvante, dosis tan bajas como 0,004 µg de rHA0 produjeron anticuerpos significativos. Los animales inmunizados con rHA (pura) produjeron aproximadamente los mismos niveles de anticuerpos anti-HA que la vacuna comercial. El alumbre aumentó la inmunogenicidad de rHA, y se generaron títulos anti-HA que eran 10 veces o más superiores a cuando no había adyuvante.

55 En resumen, la comparación de la inmunogenicidad de rHA0s purificadas con una vacuna de virión completo de

gripe (FLUZONE®, Connaught Laboratories, Inc., Swiftwater, PA), demuestra que la rHA0 provoca una respuesta inmune similar en ratones a lo largo de un periodo de 42 días. La adsorción de la rHA0 a alumbre aumenta significativamente la inmunogenicidad de la rHA0 purificada en ratones, según se ha medido mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 7. La combinación con alumbre activa anticuerpos de hemaglutinina IgG que son superiores a las vacunas contra la gripe de Fluzone®.

Ejemplo 9: Estudios de inhibición de hemaglutinina.

Los anticuerpos de inhibición de hemaglutinina (HAI) se unen a tres de cuatro epítomos conocidos sobre la hemaglutinina, y bloquean la capacidad de la gripe para aglutinar células sanguíneas rojas (Wilson y col., "Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A° resolution", *Nature*, 289: 366-378 (1981)). Estos determinantes antigénicos se agrupan alrededor del sitio de unión de receptor de ácido siálico sobre trímeros de hemaglutinina. Los anticuerpos contra estos sitios neutralizarán la infectividad del virus (Weis y col., "Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid", *Nature* 333: 426-431 (1988)). El título y la especificidad de anticuerpos HAI son una medida importante del potencial de que una vacuna contra la gripe proteja contra la infección de la misma y cepas similares de gripe.

Se llevaron a cabo estudios en ratones que comparan la capacidad de rHA0 purificada a partir de A/Pekín/353/89 y FLUZONE® (Connaught Laboratories, Inc., Swiftwater, PA) para activar anticuerpos HAI. Se inyectó a grupos de 5 ratones en los días 0 y 28 con 0,5 µg, 0,1 µg, 0,02 µg ó 0,04 µg de rHA0, o tres veces estas cantidades de hemaglutinina de FLUZONE® de tal modo que se administraron niveles iguales de hemaglutinina de A/Pekín/353/89 recombinante o vírica. Por ejemplo, los ratones del grupo de dosis más alta fueron inmunizados con 1,5 µg de hemaglutinina de FLUZONE® (0,5 µg de hemaglutinina de cada cepa) y 0,5 µg de rHA0. La presencia de antígeno de hemaglutinina adicional en FLUZONE® procedente de otras dos cepas de gripe puede dar como resultado algunos anticuerpos que dan reacción cruzada.

Se midieron los anticuerpos anti-hemaglutinina (IgG de hemaglutinina) en un ELISA de dilución estándar contra rHA0 purificada. Se midieron los anticuerpos HAI contra 4 unidades de hemaglutinina de los siguientes antígenos: virus completo de gripe A/Pekín/353/89 (A/Pek), antígeno de A/Pekín/353/89 de rHA0 purificada, y FLUZONE®. El título de HAI es el recíproco de la mayor dilución de antisuero que inhibe la aglutinación de células sanguíneas de pollo al 50%.

La Tabla 3 resume los títulos de IgG y HAI de hemaglutinina en los ratones al 42° día. Se produjeron niveles elevados de anticuerpos de anti-hemaglutinina con la vacuna de rHA0 recombinante. Éstos fueron unas diez veces mayores que los de FLUZONE®. Lo más significativo es que la vacuna de rHA0 produjo buenos títulos de anticuerpos que bloquean la aglutinación de células sanguíneas rojas mediante el virus A/Pekín/353/89 y antígenos de rHA0. Por tanto, la vacuna de rHA0 produjo anticuerpos de HAI que reconocieron igual de bien el inmunógeno y el virus de la gripe A/Pekín. Los menores títulos de HAI frente a FLUZONE® pueden ser debidos a la incapacidad de los antisueros para bloquear la aglutinación por las otras dos cepas de hemaglutinina de la vacuna de FLUZONE®. Por el contrario, los ratones inmunizados con FLUZONE® producen elevados anticuerpos de HAI cuando se miden sólo contra sí mismos. Los títulos de HAI contra virus de la gripe A/Pekín/353/89 y el antígeno de rHA0 se vieron reducidos considerablemente. Comportamientos similares se observaron en los ratones de los grupos de dosis más bajas.

Tabla 3. Títulos de HAI frente a rHA0 y FLUZONE®.

Ratón nº	rHA0 A/Pek (día 42)				FLUZONE® (día 42)			
	IgG de HA		HAI		IgG de HA		HAI	
	rHA0	A/Pek	rHA0	FLUZONE	rHA0	A/Pek	rHA0	FLUZONE
1	4.096.000	1.920	960	15	256.000	<10	<10	600
2	4.096.000	480	480	15	512.000	120	120	600
3	8.192.000	1.920	960	15	256.000	60	60	300
4	4.096.000	960	960	30	128.000	30	30	400
5	4.096.000	1.920	960	60	512.000	80	80	400
MEDIA	4.915.000	1.440	864	27	332.800	58	58	460

Estos datos también sugieren que existen diferencias genéticas entre la cepa de gripe A/Pekín/353/89 en FLUZONE® y esta misma cepa de la gripe obtenida de la FDA y pasada una vez en huevos antes de ser usada en el ensayo de HAI. El hecho de que los anticuerpos producidos en respuesta a la HA0 recombinante clonada a partir de A/Pekín/353/89 bloqueen la aglutinación de células sanguíneas rojas por esta cepa de la gripe, así como a sí mismos, es una buena evidencia de que no se han producido cambios genéticos durante el proceso de clonación que afecten al sitio de unión de receptor de ácido siálico en el antígeno de rHA0 purificada.

Ejemplo 10: Formulación y eficacia clínica de la vacuna contra la gripe de 1993/1994.

Se llevó a cabo una serie de ensayos clínicos con humanos para caracterizar la seguridad y la inmunogenicidad en humanos de una vacuna experimental contra la gripe que contenía HA recombinante, y para obtener datos preliminares relativos a la eficacia protectora de dicha vacuna frente a la infección natural durante una temporada epidémica. Los resultados demuestran que las vacunas que contienen la hemaglutinina recombinante de gripe (rHA0), producidas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, sorprendentemente causaron menos reacciones adversas locales, y proporcionaron una respuesta inmune protectora equivalente o superior en comparación con una vacuna de gripe atenuada licenciada producida en huevos y disponible comercialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vacunas. Las vacunas de HA recombinante usadas en este estudio contenían glicoproteína HA no separada de longitud completa (HA0) procedente de virus de la gripe A/Pekín/32/92 (H3N2). La HA0 recombinante (rHA0) fue producida en cultivos de células de Lepidóptero (insecto) después de exposición a un vector de baculovirus que contiene injertos de ADNc que codifican el gen de HA. La proteína expresada se purificó en condiciones no desnaturizantes hasta >95%, tal como se determina mediante densitometría de barrido cuantitativa de la masa de antígeno sometida a electroforesis sobre geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico. La identidad del péptido se confirmó mediante análisis de aminoácidos, secuenciado N-terminal y análisis de transferencia Western con sueros anti-gripe A/Pekín/32/92. Las vacunas de rHA0 contenían una cantidad específica del antígeno de HA sintético disuelto en una disolución salina tamponada de fosfato o adsorbida en adyuvante de fosfato de aluminio (alumbre) en forma de una suspensión en gel. La vacuna de subvirión trivalente licenciada usada en este estudio contenía 15 µg/dosis de cada una de las HAs de virus de la gripe A/Texas/36/91 (N1N1), A/Pekín/32/92 (H3N2) y B/Panamá/45/90 (vacuna de la gripe atenuada FLUZONE® producida en huevos, Connaught Laboratories, Swiftwater, PA).

Estudios clínicos. El Institutional Review Boards de la Universidad de Saint Louis y la Universidad de Rochester aprobaron protocolos de estudio idénticos. Ambas instituciones reclutaron adultos sanos de edades entre 18 y 45 años. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente para recibir una de las siguientes cinco preparaciones de vacuna de un modo doblemente ciego: (1) 15 µg de rHA0, (2) µg de rHA0 más alumbre, (3) 90 µg de rHA0, (4) vacuna contra la gripe inactiva trivalente licenciada, ó (5) placebo salino. Las vacunas fueron administradas mediante inyección intramuscular en un volumen de 0,5 mL. Para permitir una determinación inicial de la seguridad de las tres preparaciones de vacuna que contenían rHA0, los primeros 25 sujetos en ser vacunados fueron distribuidos (es decir, 5 personas por rama de estudio) independientemente de los otros sujetos, y fueron monitorizados de cerca mediante contacto telefónico durante 48 horas después de la vacunación, antes de proceder con el resto de vacunaciones. Todos los sujetos recibieron instrucciones de rellenar una tarjeta de informe diario con las reacciones adversas, incluyendo tanto síntomas locales como sistémicos, durante los primeros 6 días después de la vacunación. Los síntomas se auto-graduaban como leves, moderados o graves en naturaleza. Si los participantes se sentían con fiebre se tomaban la temperatura oral y la registraban. Si se daba, un hinchamiento localizado o un eritema en la zona de la inyección era graduada según si el área era inferior o superior al tamaño de una moneda de 25 centavos de dólar en diámetro, respectivamente. Todas las vacunaciones se llevaron a cabo durante la última semana de noviembre y la primera de diciembre de 1993. Se obtuvieron especímenes de suero de todos los sujetos en el momento de la vacunación, 3 semanas después de la vacunación y una vez más a finales de marzo o abril de 1994, al menos 2-3 semanas después de que los virus de la gripe ya no estuvieran en circulación en las comunidades locales. Los voluntarios de cada institución recibieron instrucciones de ponerse en contacto con el centro de estudio si experimentaban una enfermedad de tipo gripe durante la temporada epidémica de gripe invernal. Se definió una enfermedad de tipo gripe como la presencia de cualquier síntoma(s) de dos días o más de duración acompañado de fiebre y/o síntomas sistémicos de mialgias o resfriado. Los sujetos que informaron de síntomas de tipo gripe eran sometidos a tomas de muestras nasales y faríngeas obtenidas para cultivo e identificación del virus. A los especímenes clínicos se les asignaron números de identificación codificados y se procesaron de un modo ciego.

Serología. Para cada tipo de ensayo serológico, todos los especímenes de ambas instituciones fueron evaluados en un lote por un único laboratorio. Los anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HAI) para el antígeno de virus de gripe A/Pekín/32/93 (H3N2) se midieron en sueros empleando un ensayo de microtitulación estándar, seguido de la eliminación de inhibidor no específico con enzima destructora de receptor y de aglutininas frías mediante hemadsorción a 4°C. Se definió el título como la mayor dilución de suero que previene completamente la hemaglutinación mediante 4 unidades de antígeno de virus, usando 1:4 como dilución de partida. Se midieron los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) específicos de HA mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzima

(ELISA), usando rHA0 purificada procedente de gripe A/Pekín/32/92 (H3N2) como antígeno de cubrición. La secuencia de reactivos desde la fase sólida hacia el exterior consistió en (1) antígeno de rHA0 purificada, (2) suero espécimen, (3) IgG anti-humano de cabra conjugado a fosfatasa alcalina, y (4) sustrato de p-nitrofenil fosfato disódico. El título ELISA se expresó como la mayor dilución a la que la densidad óptima del pocillo que contiene al antígeno fue al menos el doble del correspondiente pocillo de control sin antígeno. Se midieron los anticuerpos neutralizantes usando el ensayo de microneutralización descrito previamente por Treanor, J.J., y Betts, R.F., *J. Infect. Dis.* 168: 455-459 (1993). En resumen, se mezclaron diluciones en serie de sueros desactivados térmicamente con aproximadamente TCID₅₀ de virus de la gripe A/Pekín/32/92 (H3N2) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, la mezcla virus-suero se adsorbió hasta obtener monocapas confluentes de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en placas de 96 pocillos durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas para eliminar el inóculo residual, se realimentó MEM de Dulbecco libre de suero con 2 µg/mL de tripsina y se incubó en CO₂ al 5% a 33°C durante 72 h. A continuación se fijaron las células con metanol y se determinó la replicación vírica usando un panel de anticuerpos monoclonales murinos específicos para la matriz y las nucleoproteínas de virus de la gripe A (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, GA), seguido de IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina. El título de punto final de los sueros se definió como la mayor dilución que da como resultado más del 50% de reducción de la señal en comparación con los pocillos de control no neutralizados.

Virología. Se llevaron a cabo cultivos víricos de especímenes de muestras nasofaríngeas en cada institución empleando técnicas estándares. Los especímenes fueron inoculados en células MDCK o en células de riñón de mono Rhesus y se incubaron a 33°C durante 14 días. Se evaluó la hemadsorción de monocapas de células con eritrocitos de cobaya al 0,4%. Los virus de la gripe fueron identificados en los cultivos de hemadsorción positiva mediante HAI usando antisueros específicos de H3 (Centro para el Control de Enfermedades, CDC).

Análisis estadístico. Los títulos de HAI recíproco, de IgG de ELISA y de anticuerpos neutralizantes se transformaron logarítmicamente para realizar un análisis estadístico. Se definió una respuesta a la vacunación como significativa cuando era un aumento del título de anticuerpos de cuatro veces o más entre los especímenes de suero pre-vacunación y 3 semanas después de la vacunación. La evidencia en laboratorio de infección con virus de la gripe A (H3N2) se definió como el aislamiento del virus a partir de secreciones nasofaríngeas y/o un aumento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos HAI en suero entre el espécimen de 3 semanas después de la vacunación (pretemporada), recolectado en diciembre, y el espécimen de post-temporada correspondiente recolectado en la siguiente primavera. Las diferencias entre grupos de vacuna se analizaron usando el ensayo exacto de Fisher para comparar las proporciones de sujetos con reacciones adversas, respuestas de anticuerpos significativas o enfermedad o infección de gripe confirmada en laboratorio, y análisis de varianza (ANOVA) para comparar la media logarítmica recíproca de los títulos de anticuerpos post-vacunación. Se aplicaron los ensayos de desigualdad de Bonferroni modificado y de Tukey-Kramer cuando fue apropiado para posibilitar comparaciones múltiples.

RESULTADOS

Reactogenicidad. Las vacunas de rHA0 usadas en este estudio fueron seguras y bien toleradas. La frecuencia de reacciones adversas no pareció estar influenciada por el cambio de dosis de antígeno de rHA0 entre 15 µg y 90 µg, pero puede haber sido incrementada ligeramente con la adición de alumbre. Los eritemas localizados, el dolor y la ternura de la zona de inyección fueron reportados de manera significativa más frecuentemente por los receptores de la vacuna de subvirión licenciada que por los receptores de 15 µg o de 90 µg de rHA0 en salino. Con la excepción de un individuo que experimentó un dolor moderadamente severo, ternura y rigidez en el brazo después de la inmunización con la vacuna licenciada, todos los síntomas fueron graduados como de naturaleza suave y generalmente tuvieron una duración de 1-2 días. El eritema localizado y/o la induración, cuando se produjeron, eran invariablemente menores en tamaño que el área de una moneda de 25 centavos de dólar.

Inmunogenicidad. Los títulos de línea base de anticuerpos HAI en suero contra virus de la gripe A/Pekín/32/92 (H3N2) fueron inferiores o iguales a 1:8 en 64 (50%) de los 127 sujetos alistados. La mayoría de los sujetos de cada uno de los cuatro grupos de vacuna presentaron respuestas serológicas específicas de HA, determinadas mediante HAI y ELISA (Tabla 4). Los títulos post-vacunación de anticuerpos HAI en suero fueron superiores o iguales a 1:32 en todos los receptores de vacuna, con las excepciones de dos personas a las que se administraron 15 µg de rHA0 y una a la que se administró la vacuna licenciada. Asimismo, la vacunación se asoció con la producción de anticuerpos neutralizantes en la mayoría de los voluntarios. Los aumentos en la media de los títulos de anticuerpos y las tasas de seroconversión tendían a ser ligeramente menores después de la inmunización con 15 µg de rHA0 que con la vacuna licenciada, aunque dichas diferencias no fueron significativas estadísticamente. La respuesta de anticuerpos a rHA0 no se vio potenciada por la adición de alumbre. Los sujetos inmunizados con 90 µg de rHA0 alcanzaron unos títulos medios de anticuerpos de HAI y de IgG de ELISA que fueron de dos a cinco veces superiores a los de cualquiera de los otros tres grupos de vacunación (las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los títulos de HAI en suero).

Eficacia protectora. Durante el periodo de vigilancia, se produjeron un total de 28 casos de enfermedad de tipo gripe, reportados por 26 sujetos. Cuatro de estos individuos (tres de los cuales habían recibido placebo y el otro había sido inmunizado con 15 µg de rHA0) presentaron virus de la gripe A (H3N2) aislado a partir de cultivos

5 nasofaríngeos. También se produjeron aumentos significativos en el título de anticuerpos HAI frente a la gripe A/Pekín/32/92 (H3N2) entre los especímenes de suero de pretemporada y los de post-temporada en tres de los cuatro casos de cultivos confirmados, pero no en ningún otro individuo que reportó enfermedad. El único receptor de rHA0 que posteriormente desarrolló enfermedad de la gripe confirmada en laboratorio dio positivo en el cultivo
 10 tomado a los 31 días después de la inmunización, y se había seroconvertido desde un título de HAI prevacunación inferior a 1:4 hasta un título de post-vacunación (pretemporada) de 1:32. Dos receptores de placebo adicionales y un voluntario inmunizado con vacuna licenciada presentaron evidencia serológica de infección con virus de la gripe A (H3N2) durante la temporada epidémica en ausencia de enfermedad clínica. En comparación con todos los sujetos vacunados (o con todos los sujetos que recibieron cualquier vacuna de rHA0) como un grupo, una proporción significativamente mayor de receptores de placebo presentaron enfermedad de gripe a (H3N2) confirmada en laboratorio ($p < 0,05$), o infección ($p < 0,005$).

15 Los anteriores descubrimientos indican que las vacunas contra la gripe que contienen antígeno de rHA0 purificada, preparadas como se ha descrito en la solicitud de patente identificada anteriormente, son bien tolerados y capaces de activar respuestas inmunes protectoras en sujetos humanos. Incluso a una dosis de 90 µg, la rHA0 evaluada en este estudio no fue más reactivogénica que el placebo salino, y provocó significativamente menos reacciones adversas locales que la vacuna de subvirión trivalente licenciada que contenía la mitad (es decir, 45 µg) de antígeno de HA total.

20 Las respuestas de anticuerpos específicos de HA neutralizantes a la preparación de 15 µg de rHA0 fueron comparables a las provocadas por la vacuna de subvirión, y mejoraron significativamente aumentando la dosis de rHA0 hasta los 90 µg.

25 Las tasas globales de infección y enfermedad que resultan de la exposición natural a la cepa epidémica en circulación de virus de la gripe A (H3N2) fueron significativamente inferiores entre los sujetos vacunados que entre los receptores de placebo. Estos datos sugieren que la inmunidad protectora conferida por la rHA0, particularmente cuando se administra a dosis elevadas, es comparable o superior a la inducida por las vacunas disponibles actualmente.

Tabla 4. Respuestas de anticuerpos en suero en sujetos adultos jóvenes después de inmunización con vacunas que contienen hemaglutinina recombinante (rHA0) purificada procedente de A/Pekín/32/92 (H3N2), subvirión trivalente licenciado que contiene 15 µg de HA procedente de A/Pekín/32/92 (H3N2), o placebo salino.

Vacuna (Número en el grupo)	Anticuerpo de HAI			% con aumento ≥ 4x		% con ≥1:32 post		Anticuerpo de HA IgG ELISA			% con aumento ≥ 4x		Anticuerpo neutralizante		
	Título HAI		Post	aumento ≥ 4x	≥1:32 post	Título ELISA		aumento ≥ 4x	Título de microneutralización		aumento ≥ 4x	Título de microneutralización		aumento ≥ 4x	
	Pre	Post				Pre	Post		Pre	Post					
rHA0 15 µg (26)	3,7±0,3	9,0±0,6*		85	92	8,7±0,3	12,0±0,3	88	5,7±0,3	10,0±0,4	85	5,7±0,3	10,0±0,4	85	
rHA0 15 µg más alumbre (26)	4,3±0,5	8,6±0,4*		88	100	9,4±0,4	11,5±0,4	76	6,4±0,4	9,3±0,2	76	6,4±0,4	9,3±0,2	76	
rHA0 90 µg (26)	3,3±0,4	11,1±0,3		100	100	8,5±0,4	13,1±0,4	100	5,7±0,3	10,2±0,4	96	5,7±0,3	10,2±0,4	96	
Subvirión licenciado (26)	3,7±0,4	9,3±0,5*		100	96	8,1±0,4	12,0±0,4	92	5,8±0,3	9,9±0,4	96	5,8±0,3	9,9±0,4	96	
Placebo (24)	3,7±0,5	3,8±0,5*		0	38	9,1±0,3	9,1±0,3	0	5,3±0,4	5,4±0,4	8	5,3±0,4	5,4±0,4	8	

HAI, inhibición de hemaglutinación; HA, hemaglutinina; ELISA, ensayo inmunosorbente ligado a enzima. Los especímenes de suero post-vacunación fueron obtenidos tres semanas después de la inmunización. Los títulos de anticuerpos se expresan como $\log_2 \pm \text{SEM}$ medias recíprocas. Las comparaciones estadísticas se realizan entre el título de HAI post-vacunación medio del grupo designado y el del grupo de vacuna de rHA0 de 90 µg mediante análisis de varianza con el ensayo de Dunnett para comparaciones múltiples. *, $P < 0,01$; +, $P < 0,05$; #, $P < 0,01$.

Ejemplo 11: Método para preparar un vector de clonación de HA0 mejorado

Se diseñó un vector de clonación mejorado para la expresión de HA madura en el que el gen que codifica la HA se localiza inmediatamente por debajo (en dirección 3') de la secuencia que codifica el péptido señal de quitinasa.

Se creó pMGS27 lineal con colas de cadena sencilla

- 5 En el plásmido pMGS12 se clonó HA en sitios *SmaI* o *KpnI* inmediatamente por debajo del péptido señal de quitinasa. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos se muestran respectivamente como SEC ID N°: 22 y SEC ID N° 23.

5'-péptido señal de quitinasa *SmaI* *KpnI*
 TGG TTG GTC GCC GTT TCT AAC GCG ATT CCC GGG GGT ACC
 10 TRP LEU VAL ALA VAL SER ASN ALA ILE PRO GLY GLY THR

Esta región fue cambiada mediante mutagénesis oligodirigida para crear pMGS27 (las bases cambiadas están subrayadas) (SEC ID N°: 24):

5'-TGG TTA GTC GCC GTG TCCTGCAGGCCAGAGAGGCCTT GGT ACC
PstI

- 15 El plásmido pMGS27 se linealizó mediante corte con *PstI* (residuos 6-35 de la SEC ID N°: 24 mostrada):

A GTC GCC GTG TCC TGCA 5' GGCCAGAGAGGCC T
 T CAG CGG CAC AGG 5' ACGTCCGGTCTCTCCGG A

A continuación se trató el pMGS27 lineal con ADN polimerasa T4 más dATP para crear colas de cadena sencilla como se muestra a continuación (residuos 23-36 y complemento de los residuos 6-18 de la SEC ID N°: 24):

- 20 A 5' GGCCAGAGAGGCC T
 T CAG CGG CAC AGG 5' A

El gen de HA Diana se clonó en pMGS27

Etapa 1. Se sintetizaron los cebadores PCR. Oligo hacia adelante (SEC ID N°: 25):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (20 bases del extremo 5' de la HA madura)

- 25 Oligo inverso (complemento de la SEC ID N°: 26):

(20 bases del extremo 3' de la HA madura) ATT AA CCGGTCTCTCCGG 5'

PCR del gen de HA

Se usó PCR del gen de HA diana con los dos oligos para obtener (SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 26):

- 30 5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (HA madura)
 CAG CGG CAC AGG TTG CGC (HA madura)
 TAA TTGGCCAGAGAGGCC 3'
 ATT AACCGGTCTCTCCGG

Madurar el gen de HA en pMGS27 y transformar *E. coli*

- 35 Se mezcló pMGS27 lineal y el fragmento del gen de HA de PCR tratado con ADN polimerasa T4. Las dos molécula se maduran una con la otra por formar un plásmido circular que es fácil de usar para transformar *E. coli*. El diagrama incluye las SEC ID N°: 25 y 26, los residuos 23-36 y 6-18 de la SEC ID N°: 24.

GTCGCCGTGTCCAACGCG (HA madura) TAATT
 TTGCGC (HA madura) ATTAACCGGTCTCTCCGG
 +

- 40 A GGCCAGAGAGGCCT
 TCAGCGGCACAGG A

péptido señal de quitinasa para parada
GTCGCCGTGTCCAACGCG (HA madura) TAATTGGCCAGAGAGGCCT

- 45 Tal como se muestra, no hay un aminoácido extra entre el péptido señal y la HA madura.

Ejemplo 12: Preparación y eficacia de los tipos trivalentes de vacuna contra la gripe A y B de 1995-1996

(A/Texas/36/92\1 (H1N1), A/Johanesburgo/33/94 (H3N2) y B/Harbin/7/94) se una subunidad no infecciosa derivada a partir de antígenos de hemaglutinina (HA) de gripe recombinante. Los genes de HA fueron clonados a partir de las cepas recomendadas por el CDC y la FDA de virus de gripe A y B, tal como se ha descrito antes, y la identidad de cada gen clonada se determinó mediante análisis de secuencia de ADN. Se usaron vectores de expresión de baculovirus que contienen los genes de HA clonados a partir de las cepas de virus de la gripe A/Texas/36/91 (H1N1), A/Johanesburgo/33/94 (H3N2), B/Harbin/7/94 para producir los antígenos de HA recombinantes en células de insecto cultivadas. Las proteínas de HA recombinantes son hemaglutininas no separadas (rHA0) de longitud completa con un peso molecular de aproximadamente 69.000. Las rHA0 fueron producidas en una línea celular de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptero) mantenida en un medio de cultivo libre de suero. La vacuna trivalente está compuesta de rHA0 purificada (pura a más del 95%, más probablemente pura a más del 99%) procedente de dos cepas de gripe A y una cepa de gripe B mezcladas en proporciones iguales. La vacuna se suministra para uso clínico como proteínas de rHA0 purificadas de tipos A y B en disolución salina tamponada de fosfato sin conservantes añadidos.

Los estudios en animales con vacunas de rHA0 monovalentes, bivalentes y trivalentes han demostrado que están libres de una toxicidad significativa. No existen agentes detectables tóxicos o perjudiciales en la vacuna. Se llevaron a cabo estudios de seguridad general y de inmunogenicidad de rHA0 de A/Pekín/32/92 y A/Texas/36/91 en ratones y en cobayas. No se observaron reacciones adversas. En ratones, una única inmunización con 15 microgramos de antígenos de rHA0 sin adyuvante induce en dos-tres semanas niveles elevados de anticuerpos IgG anti-HA, anticuerpos de inhibición de hemaglutinina (HAI) y anticuerpos neutralizantes.

En un estudio, se inmunizaron grupos de diez ratones con 15 microgramos de rHA0 purificada de A/Pekín/32/92 (H3N2) preparada en células adaptadas a un medio que contiene suero bovino fetal al 10%, o rHA0 preparada en células de insecto adaptadas a un medio que contiene suero bovino fetal al 10%, o rHA0 preparada en células de insecto adaptadas a un medio libre de suero (rHA0-SF). A las dos-tres semanas después de la inyección, se tomaron muestras de sangre de los ratones y se prepararon muestras de suero. Se midieron los anticuerpos IgG anti-HA y HAI en los sueros. Los antígenos de rHA0 y de rHA0-SF provocan títulos similares de anticuerpos anti-HA y HAI. Los antígenos de rHA0 y rHA0-SF provocan títulos similares de anticuerpos anti-HA y HAI. Dos semanas después de la inmunización sencilla, la mayoría de los ratones presentaban títulos significativos de anticuerpos HAI y a la tercer semana 8/10 ratones de cada grupo presentaban títulos de HAI de 32 o más. Estos y otros estudios bioquímicos e inmunológicos demuestran que la rHA0 producida en cultivo de células de insecto libre de suero es indistinguible de la rHA0 fabricada en condiciones de fermentación que contiene suero.

Se llevó a cabo un estudio para comparar la formulación de 1994-1995 de la vacuna contra la gripe de rHA0 trivalente con una vacuna de antígeno superficial de virus purificado licenciada, Fluvirin® (una vacuna vírica de gripe atenuada producida mediante cultivo en huevos). Cada vacuna contenía 15 microgramos de rHA0 o de HA vírico por cada 0,5 mL de las cepas de gripe A/Texas/36/91 (H1N1), A/Shangdong/9/93 (H3N2) y B/Panamá/45/90.

Tabla 5. Comparación de vacuna de rHA0 trivalente con Fluvirin®.

GMT (n=10 ratones)	Vacuna contra la gripe GMT (n=10 ratones)			
	rHA0 trivalente		Fluvirin®	
	IgG anti-HA		IgG anti-HA	
Cepa de virus usada como antígeno	Semana 0	Semana 3	Semana 0	Semana 3
A/Texas/36/91 (H1N1)	<1000	103.000	<1000	11.200
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<1000	162.400	<1000	41.000
B/Panamá/45/90	<1000	164.800	<1000	26.000
Cepa de virus usada como antígeno	HAI		HAI	
A/Texas/36/91 (H1N1)	<8	1.522	<8	1.088
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<8	494	<8	435
B/Panamá/45/90	<8	174	<8	42
Cepa de virus usada como antígeno	Ab neutralizantes		Ab neutralizantes	
A/Texas/36/91 (H1N1)	<100	5.800	<100	2.720
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<100	840	<100	360
B/Panamá/45/90	<100	1.300	<100	700

LISTADO DE SECUENCIAS

- (1) INFORMACIÓN GENERAL:
- 5 (i) SOLICITANTE: MicroGeneSys, Inc.
 - (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: MÉTODO PARA PRODUCIR VACUNAS CONTRA LA GRIPE MULTIVALENTES DE HEMAGLUTININA
 - (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 32
 - (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
 - 10 (A) DESTINATARIO: Patrea L. Pabst
 - (B) CALLE: 2800 One Atlantic Center; 1201 West Peachtree Street
 - (C) CIUDAD: Atlanta
 - (D) ESTADO: GA
 - (E) PAÍS: EE.UU.
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 30309-3450
 - 15 (v) FORMATO LEGIBLE EN COMPUTADORA:
 - (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 - (B) COMPUTADORA: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, versión 1.25
 - 20 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
 - (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US95/06750
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 26-MAYO-1995
 - (C) CLASIFICACIÓN:
 - 25 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
 - (A) TELÉFONO: (404)-873-8794
 - (B) TELEFAX: (404)-873-8795
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 1:
- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 12 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (iii) HIPOTÉTICA: NO
 - (iv) ANTISENTIDO: NO
 - (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - 40 (x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
 - (A) AUTOR: Davis y col.
 - (B) TÍTULO: Construction and Characterization of a Bacterial Clone Containing the Hemagglutinin Gene of the WSN Strain (H0N1) of Influenza Virus
 - (C) REVISTA: Gene
 - (D) VOLUMEN: 10
 - 45 (F) PÁGINAS: 205-218
 - (G) FECHA: 1980
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

50
AGCAAAAGCA GG

12

55

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 2:
- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 39 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

5

GGGGGTACCC CCGGGAGCAA AAGCAGGGGA AAATAAAAA

39

10

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 3:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 35 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:

15

20

25

CCCGGTACCT CAAATKATA TTCTGCACTG CAAAG

35

30

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 4:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 39 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:

35

40

GGGGGTACCC CCGGGGACAC AATATGTATA GGCTACCAT

39

45

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 5:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 35 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:

50

55

60

CCCGGTACCT CAAATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

35

5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1793 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

15

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
- (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Pekín/32/92

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: ARNm líber de polihedrina (parcial)
- (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18

20

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para la secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
- (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 72

25

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
- (B) LOCALIZACIÓN: 76 a 81

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
- (B) LOCALIZACIÓN: 73 a 1728

30

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
- (B) LOCALIZACIÓN: 1771 a 1777

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BglII
- (B) LOCALIZACIÓN: 1776 a 1782

35

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
- (B) LOCALIZACIÓN: 1783 a 1793

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGACTTTCCA GGAAATGACA ACAGCACAGC AACGCTGTGC 120

45

CTGGGACATC ATGCAGTGCC AAACGGAAACG CTAGTGAAAA CAATCACGAA TGATCAAATT 180
 GAAGTGACTA ATGCTACTGA GCTGGTTCAG AGTTCCTCAA CAGGTAGAAT ATGCGACAGT 240
 CCTCACCGAA TCCTTGATGG AAAAACTGC AACTTGATAG ATGCTCTATT GGGAGACCCT 300
 CATTGTGATG GCTTCCAAAA TAAGGAATGG GACCTTTTTG TTGAACGCAG CAAAGCTTAC 360
 AGCAACTGTT ACCCTTATGA TGTACCGGAT TATGCCTCCC TTAGGTCACT AGTTGCCTCA 420
 TCAGGCACCC TGGAGTTTAT CAATGAAGAC TTCAATTGGA CTGGAGTCGC TCAGGATGGG 480
 GGAAGCTATG CTTGCAAAAAG GGGATCTGTT AACAGTTTCT TTAGTAGATT GAATTGGTTG 540
 CACAAATCAG AATACAAAATA TCCAGCGCTG AACGTGACTA TGCCAAAACA TGGCAAATTT 600
 GACAAATTGT ACATTTGGGG GGTTCACCAC CCGAGCACGG ACAGAGACCA AACCAGCCTA 660
 TATGTTGAG CATCAGGGAG AGTCACAGTC TCTACAAAA GAAGCCAACA AACTGTAACC 720
 CCGAATATCG GGTCTAGACC CTGGGTAAGG GGTCAGTCCA GTAGAATAAG CATCTATTGG 780
 ACAATAGTAA AACCGGGAGA CATACTTTTG ATTAATAGCA CAGGGAATCT AATTGCTCCT 840
 CGGGGTTACT TCAAAATACG AAATGGGAAA AGCTCAATAA TGAGGTCAGA TGCACCCATT 900
 GGCACCTGCA GTTCTGAATG CATCACTCCA AATGGAAGCA TTCCCAATGA CAAACCTTTT 960
 CAAAATGTAA ACAGGATCAC ATATGGGGCC TGCCCCAGAT ATGTTAAGCA AAACACTCTG 1020
 AAATTGGCAA CAGGGATGCG GAATGTACCA GAGAAACAAA CTAGAGGCAT ATTCGGCGCA 1080
 ATCGCAGGTT TCATAGAAAA TGGTTGGGAG GGAATGGTAG ACGGTTGGTA CGGTTTCAGG 1140
 CATCAAAATT CTGAGGGCAC AGGACAAGCA GCAGATCTTA AAAGCACTCA AGCAGCAATC 1200
 GACCAAATCA ACGGGAAACT GAATAGGTTA ATCGAGAAAA CGAACGAGAA ATTCCATCAA 1260
 ATCGAAAAAG AATTCTCAGA AGTAGAAGGG AGAATTCAGG ACCTCGAGAA ATATGTTGAA 1320
 GACACTAAAA TAGATCTCTG GTCTTACAAC GCGGAGCTTC TTGTTGCCCT GGAGAACCAA 1380
 CATACAATTG ATCTAACTGA CTCAGAAATG AACAACTGT TTGAAAAAC AAGGAAGCAA 1440
 CTGAGGGAAA ATGCTGAGGA CATGGGCAAT GGTGCTTCA AAATATACCA CAAATGTGAC 1500
 AATGCCTGCA TAGGGTCAAT CAGAAATGGA ACTTATGACC ATGATGTATA CAGAGACGAA 1560
 GCATTAAACA ACCGGTTCCA GATCAAAGGT GTTGAGCTGA AGTCAGGATA CAAAGATTGG 1620
 ATCCTATGGA TTTCTTTGTC CATATCATGC TTTTGTCTTT GTGTTGTTTT GCTGGGGTTC 1680
 ATCATGTGGG CCTGCCAAAA AGGCAACATT AGGTGCAACA TTTGCATTTG AGTGTATTAA 1740
 TTAAAAACAC CTTGTTTTCT AGGATGATTC GGTACCAGAT CTTAATTAAT TAA 1793

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 7:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 570 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 - (iii) HIPOTÉTICA: NO

5
10

- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Pekín/32/92
- 5 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 10 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 552
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 7:

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Pro Gly Asp Phe Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr
 20 25 30
 Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr
 35 40 45
 Ile Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln
 50 55 60
 Ser Ser Ser Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu Asp
 65 70 75 80
 Gly Lys Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys
 85 90 95
 Asp Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys
 100 105 110
 Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu
 115 120 125
 Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Asp
 130 135 140
 Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys Lys
 145 150 155 160
 Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Lys
 165 170 175
 Ser Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Gly
 180 185 190
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp
 195 200 205
 Arg Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr Val
 210 215 220
 Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser Arg
 225 230 235 240
 Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile
 245 250 255
 Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile
 260 265 270
 Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile Met
 275 280 285
 Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Thr Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr Pro
 290 295 300
 Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile
 305 310 315 320
 Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
 325 330 335
 Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe
 340 345 350
 Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp
 355 360 365
 Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala
 370 375 380

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

Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
 450 455 460
 Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu
 465 470 475 480
 Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala
 485 490 495
 Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg
 500 505 510
 Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys
 515 520 525
 Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys
 530 535 540
 Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln
 545 550 555 560
 Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 565 570

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 8:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1766 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Texas/36/91
- 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: ARNm líber de polihedrina (parcial)
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para la secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 72
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 76 a 81
- 25 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 82 a 87
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 88 a 93
- 30 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 73 a 1734
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1744 a 1749
- 35 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BglII
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1750 a 1755
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1756 a 1766
- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:

TAAAAAACC TATAATAAT GCCCTTGAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCCCC GGGGACACAA TATGTATAGG CTACCATGCG 120

AACAACCTCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTTGAGAAGA ACGTGACAGT GACACACTCT 180

GTCAACCTAC TTGAGGACAG TCACAACGGA AACTATGTC GACTAAAGGG AATAGCCCCA 240

CTACAATTGG GTAATTGCAG CGTTGCCGGA TGGATCTTAG GAAACCCAAA ATGCGAATCA 300
 CTGTTTTCTA AGGAATCATG GTCCTACATT GCAGAAACAC CAAACCCTGA GAATGGAACA 360
 TGTTACCCAG GGTATTTTCGC CGACTATGAG GAACTGAGGG AGCAATTGAG TTCAGTATCA 420
 TCATTGCGAGA GATTTCGAAAT ATTCCCCAAA GAAAGCTCAT GGCCCAACCA CACCGTAACC 480
 AAAGGAGTAA CGAGATCATG CTCCCATAAT GGGAAAAGCA GTTTTTACAG AAATTTGCTA 540
 TGGCTGACGG AGAAGAATGG CTTGTACCCA AATCTGAGCA AGTCCTATGT AAACAACAAA 600
 GAGAAAGAAG TCCTTGACT ATGGGGTGT CATCACCCGT CTAACATAAG GGACCAAAGG 660
 GCCATCTATC ATACAGAAAA TGCTTATGTC TCTGTAGTGT CTTACATTA TAGCAGAAGA 720
 TTCACCCAG AAATAGCAAA AAGACCCAAA GTAAGAGATC AAGAAGGAAG AATTAECTAC 780
 TACTGGACTC TGCTGGAACC CGGGGACACA ATAATATTTG AGGCAATGG AAATCTAATA 840
 GCGCCATGGT ATGCTTTTCGC ACTGAGTAGA GGCTTTGGGT CAGGAATCAT CACCTCAAAC 900
 GCATCAATGG ATGAATGTGA CGCGAAGTGT CAAACACCCC AGGGAGCTAT AACAGTAGT 960
 CTTCTTTCC AGAATGTACA CCCAGTCACA ATAGGAGAGT GTCCAAAGTA TGTCAGGAGT 1020
 ACAAATTAAGGATGGTTAC AGGACTAAGG AACATCCCAT CCATTCAATC CAGAGGTTTG 1080
 TTTGGAGCCA TTGCCGGTTT CATTGAAGGG GGGTGGACTG GAATGATAGA TGGATGGTAT 1140
 GGTTATCATC ATCAGAATGA ACAAGGATCT GGCTATGCTG CGGACCAAAA AAGCACACAA 1200
 AATGCCATTA ACGGGATTAC AAACAAGGTG AATTCTGTAA TCGAGAAAAT GAACACTCAA 1260
 TTCACAGCTG TGGGCAAAGA ATTCAACAAA TTAGAAAGAA GGATGGAAAA CTTAAATAAA 1320
 AAAGTTGATG ATGGATTTCT GGACATTTGG ACATATAATG CAGAATTGTT GGTTCTACTG 1380
 GAAAATGGAA GGACTTTGGA TTTTCATGAC TCAAATGTGA AGAATCTGTA TGAGAAAGTA 1440
 AAAAGCCAAT TGAAGAATAA TGCCAAAGAA ATAGGGAACG GGTGTTTTGA ATTCTATCAC 1500
 AAGTGTAACA ATGAATGCAT GGAAAGTGTG AAAAATGGAA CTTATGACTA TCCAAAATAT 1560
 TCCGAAGAAT CAAAGTTAAA CAGGGGAAAA ATTGATGGAG TGAAATTGGA ATCAATGGGA 1620
 GTCTATCAGA TTCTGGCGAT CTAECTCAACT GTCGCCAGTT CACTGGTGCT TTTGGTCTCC 1680
 CTGGGGGCAA TCAGCTTCTG GATGTGTTCT AATGGGTCTT TGCAGTGCAG AATATGAATC 1740
 TGAGGTACCA GATCTTAATT AATTAA 1766

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID N°: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 572 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Virus de la gripe

(C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Texas/36/91

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 554
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 9:

5

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
 1 . 5 10 15
 Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr Pro Gly Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr
 20 25 30
 His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn
 35 40 45
 Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly
 50 55 60
 Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys
 65 70 75 80
 Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Lys Cys Glu Ser Leu Phe
 85 90 95
 Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Ala Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn
 100 105 110
 Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu
 115 120 125
 Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys
 130 135 140
 Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Lys Gly Val Thr Arg Ser
 145 150 155 160
 Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu
 165 170 175
 Thr Glu Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn
 180 185 190
 Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Ser
 195 200 205
 Asn Ile Arg Asp Gln Arg Ala Ile Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val
 210 215 220
 Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala
 225 230 235 240
 Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp
 245 250 255
 Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn
 260 265 270
 Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser
 275 280 285
 Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys
 290 295 300
 Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val
 305 310 315 320
 His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys
 325 330 335
 Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg
 340 345 350
 Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly
 355 360 365
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser
 370 375 380
 Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile
 385 390 395 400
 Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr
 405 410 415

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

Asn	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys
				485					490					495	
Asn	Asn	Glu	Cys	Met	Glu	Ser	Val	Lys	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro
		500						505					510		
Lys	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ser	Lys	Leu	Asn	Arg	Gly	Lys	Ile	Asp	Gly	Val
		515					520					525			
Lys	Leu	Glu	Ser	Met	Gly	Val	Tyr	Gln	Ile	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr
	530	.				535					540				
Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Ser	Phe
545					550					555					560
Trp	Met	Cys	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Gln	Cys	Arg	Ile				
				565					570						

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID N°: 10:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1799 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - 15 (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de B/Panamá/45/90
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - 20 (A) NOMBRE/CLAVE: líder de ARNm de polihedrina (parcial)
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para el péptido señal de HA
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 69
- 25 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 22 a 27
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - 30 (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 70 a 1773
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1777 a 1782
- 35 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BglII
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1783 a 1788
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1789 a 1799
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 10:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA 60
 TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA 120
 ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA 180
 AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT 240
 CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT 300
 TCGGCAAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA 360
 ATGCACGACA GAACAAAAT CAGACAGCTA CCCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC 420
 AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAACGCA GAAAGAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT 480
 GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGTTACC AGTAGAGACG GATTCTTCGC AACAAATGGCT 540
 TGGGCTGTCC CAAGGGACAA CAAAACAGCA ACGAATCCAC TAACAGTAGA AGTACCATAC 600
 ATTTGTACCA AAGGAGAAGA CCAAATTACT GTTTGGGGGT TCCATTCTGA TAACAAAATC 660
 CAAATGAAA ACCTCTATGG AGACTCAAAT CCTCAAAGT TCACCTCATC TGCCAATGGA 720
 GTAACCACAC ATTATGTTTC TCAGATTGGT GGCTTCCCAA ATCAAACAGA AGACGGAGGG 780
 CTACCACAAA GCGGCAGAAT TGTGTTGAT TACATGGTGC AAAAACCTGG GAAAACAGGA 840
 ACAATTGTCT ATCAAAGAGG TGTTTTGTTG CCTCAAAGG TGTGGTGCGC AAGTGGCAGG 900
 AGCAAGGTAA TAAAAGGTC CTTGCCTTTA ATTGGTGAAG CAGATTGCCT TCACGAAAAA 960
 TACGGTGGAT TAAACAAAAG CAAGCCTTAC TACACAGGAG AACATGCAAA AGCCATAGGA 1020
 AATTGCCCAA TATGGGTGAA AACACCTTTG AAGCTTGCCA ATGGAACCAA ATATAGACCT 1080
 CCTGCAAAAC TATTAAGGA AAGGGGTTTC TTCGGAGCTA TTGCTGGTTT CTTAGAAGGA 1140
 GGATGGGAAG GAATGATTGC AGGTTGGCAC GGATACACAT CTCATGGAGC ACATGGAGTG 1200
 GCAGTGGCAG CAGACCTTAA GAGTACGCAA GAAGCCATAA ACAAGATAAC AAAAAATCTC 1260
 AATTCCTTGA GTGAGCTAGA AGTAAAGAAT CTTCAAAGAC TAAGTGGTGC CATGGATGAA 1320
 CTCCACAACG AAATACTCGA GCTGGATGAG AAAGTGGATG ATCTCAGAGC TGACACAATA 1380
 AGCTCGCAA TAGAGCTTGC AGTCTTGCTT TCCAACGAAG GAATAATAAA CAGTGAAGAT 1440
 GAGCATCTAT TGGCACTTGA GAGAAAATA AAGAAAATGC TGGGTCCCTC TGCTGTAGAC 1500
 ATAGGGAATG GATGCTTCGA AACCAAACAC AAGTGCAACC AGACCTGCTT AGACAGGATA 1560
 GCTGCTGGCA CCTTTAATGC AGGAGAATTT TCTCTTCCCA CTTTTGATT ACTGAATATT 1620
 ACTGCTGCAT CTTTAAATGA TGATGGATTG GATAATCATA CTATACTGCT CTACTACTCA 1680
 ACTGCTGCTT CTAGTTTGGC TGTAACATTG ATGATAGCTA TTTTATTGT TTATATGGTC 1740
 TCCAGAGACA ATGTTTCTTG TTCCATCTGT CTGTGAGGTA CCAGATCTTA ATTAATTA 1799

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 11:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 585 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- 5 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de B/Panamá/45/90
- 10 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: péptido señal de HA
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 17
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 18 a 568
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 11:

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

Val Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro
 35 40 45
 Leu Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr
 50 55 60
 Lys Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asn Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu
 65 70 75 80
 Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala
 85 90 95
 Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe
 100 105 110
 Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu
 115 120 125
 Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asn Ala
 130 135 140
 Glu Arg Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys
 145 150 155 160
 Pro Asn Val Thr Ser Arg Asp Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala
 165 170 175
 Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val
 180 185 190
 Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe
 195 200 205
 His Ser Asp Asn Lys Ile Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn
 210 215 220
 Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val
 225 230 235 240
 Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro
 245 250 255
 Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys Val
 275 280 285
 Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu
 290 295 300
 Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys
 305 310 315 320
 Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys
 325 330 335
 Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr
 340 345 350
 Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile
 355 360 365
 Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His
 370 375 380
 Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser
 405 410 415
 Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met
 420 425 430
 Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp
 435 440 445
 Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu
 450 455 460
 Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu
 465 470 475 480
 Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly
 485 490 495

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

Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg
 565 570 575
 Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
 580 585

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID N°: 12:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 1811 pares base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de B/Holanda/13/94
- 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: líder de ARNm de polihedrina (parcial)
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para la proteína señal de 61K de AcNPV
 (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 72
- 25 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 (B) LOCALIZACIÓN: 76 a 81
- 30 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 (B) LOCALIZACIÓN: 73 a 1785
- 35 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 (B) LOCALIZACIÓN: 1789 a 1794
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BglII
 (B) LOCALIZACIÓN: 1795 a 1800
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 (B) LOCALIZACIÓN: 1801 a 1811
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 12:
- | | |
|---|------------|
| TAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC | 60 |
| GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGATCGAATC TGCCTGGGA TAACATCTTC AAAATCACCT | 120 |
| CATGTAGTCA AACAGCTAC TCAAGGGGAG GTCAATGTGA CTGGTGTGAT ACCACTGACG | 180 |
| ACAACACCAA CAAAATCTCA TTTTGCAAAT CTCAAAGGAA CAAAGACCAG AGGGAAACTA | 240 |
| TGCCCAAACGT GTCTCAACTG CACAGATCTG GATGTGGCCT TGGGCAGACC AATGTGTGTG | 300 |
| GGGATCACAC CTTCGGCAAA AGCTTCAATA CTCCACGAAG TCAGACCTGT TACATCCGGG | 360 |
| TGCTTTCCTA TAATGCATGA CAGAACAAA ATCAGACAGC TACCCAATCT TCTCAGAGGA | 420 |
| TATGAAAACA TCAGACTATC AACCCAAAAC GTTATCAACG CAGAAAAGGC ACCAGGAGGA | 480 |
| CCCTACAGAC TTGGAACCTC AGGATCTTGC CCTAACGTTA CCAGTAGAAC CGGATTCTTC | 540 |
| GCAACAATGG CTTGGGCTGT CCCAAGGGAC AACAAAACAG CAACGAATCC ACTAACAGTA | 600 |
| GAAGTACCAT ACATTTGTAC GAAAGGAGAA GACCAAATTA CTGTTTGGGG GTTCCATTCT | 660 |
| GATAACAAA CCCAAATGAA AAACCTCTAT GGAGACTCAA ATCCTCAAAA GTTCACCTCA | 720 |
| TCTGCCAATG GAGTAACCAC ACATTATGTT TCTCAGATTG GTGGCTTCCC AGATCAAACA | 780 |

GAAGACGGAG GACTACCACA AAGCGGCAGA ATTGTTGTTG ATTACATGGT GCAAAAACCT	840
GGGAAAACAG GAACAATTGT CTATCAAAGA GGTATTTTGT TGCCTCAAAA GGTGTGGTGC	900
GCAAGTGGCA GGAGCAAGGT AATAAAAGGG TCCTTGCCTT TAATTGGTGA AGCAGATTGC	960
CTTCACGAAA AATACGGTGG ATTAACAACA AGCAAGCCTT ACTACACAGG AGAACATGCA	1020
AAAGCCATAG GAAATTGCCC AATATGGGTG AAAACACCTT TGAAGCTTGC CAATGGAACC	1080
AGATATAGAC CTCCTGCAAA ACTATTAAAG GAAAGGGGTT TCTTCGGAGC TATTGCTGGT	1140
TTCTTAGAAG GAGGATGGGA AGGAATGATT GCAGGTTGGC ACGGATACAC ATCTCACGGG	1200
GCACATGGAG TGGCAGTGGC AGCAGACCTT AAGAGTACGC AAGAAGCCAT AAACAAGATA	1260
ACAAAAATC TCAATTCTTT GAGTGAGCTA GAAGTAAAGA ACCTTCAAAG ACTAAGTGGT	1320
GCCATGGATG AACTCCACAA CGAAATACTC GAGCTGGATG AGAAAGTGGGA TGATCTCAGA	1380
GCTGACACAA TAAGCTCGCA AATAGAGCTT GCAGTCTTAC TTTCCAACGA AGGAATAATA	1440
AACAGTGAAG ATGAGCATCT ATTGGCACTT GAGAGAAAAC TAAAGAAAAT GCTGGGTCCC	1500
TCTGCTGTAG ACATAGGGAA TGGATGCTTC GAAACAAAAC ACAAGTGCAA CCAGACCTGC	1560
TTAGACAGGA TAGCTGCTGG CACCTTTAAT GCAGGAGAAT TTTCTCTTCC CACTTTTGAT	1620
TCACTGAATA TTA CTGCTGC ATCTTTAAAT GATGATGGAT TGGATAATCA TACTATACTG	1680
CTCTACTACT CAACTGCTGC TTCTAGTTTG GCTGTAAACAT TGATGATAGC TATTTTATT	1740
GTTTATATGG TCTCCAGAGA CAATGTTTTCT TGTTCCATCT GTCTGTGAGG TACCAGATCT	1800
TAATTAATTA A	1811

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 13:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 589 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - 15 (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de B/Holanda/13/94
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 571
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 13:

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

Cys Thr Asp Leu Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Ile
 85 90 95
 Thr Pro Ser Ala Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr
 100 105 110
 Ser Gly Cys Phe Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu
 115 120 125
 Pro Asn Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn
 130 135 140
 Val Ile Asn Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Cys Pro Asn Val Thr Ser Arg Thr Gly Phe Phe Ala Thr
 165 170 175
 Met Ala Trp Ala Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu
 180 185 190
 Thr Val Glu Val Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr
 195 200 205
 Val Trp Gly Phe His Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr
 210 215 220
 Gly Asp Ser Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr
 225 230 235 240
 Thr His Tyr Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp
 245 250 255
 Gly Gly Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln
 260 265 270
 Lys Pro Gly Lys Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu
 275 280 285
 Pro Gln Lys Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly
 290 295 300
 Ser Leu Pro Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly
 305 310 315 320
 Gly Leu Asn Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala
 325 330 335
 Ile Gly Asn Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn
 340 345 350
 Gly Thr Arg Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe
 355 360 365
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile
 370 375 380
 Ala Gly Trp His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val
 385 390 395 400
 Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys
 405 410 415
 Asn Leu Asn Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu
 420 425 430
 Ser Gly Ala Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu
 435 440 445
 Lys Val Asp Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu
 450 455 460
 Ala Val Leu Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His
 465 470 475 480
 Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala
 485 490 495
 Val Asp Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln
 500 505 510
 Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe
 515 520 525
 Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn
 530 535 540
 Asp Asp Gly Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala
 545 550 555 560
 Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr
 565 570 575
 Met Val Ser Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
 580 585

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID N°: 14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1757 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Shandong/9/93
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: líder de ARNm de polihedrina (parcial)
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para la proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 72
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 76 a 81
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 73 a 1728
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1735 a 1740
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BglII
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1741 a 1746
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1747 a 1757
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 14:

```

TAAAAAACCC TATAATAAT GCCCTTGTC ACATTTGTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC      60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAAGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG      120
TGCCTGGGAC ATCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA      180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGTTGGTT CAGAGTTCCT CAACAGGTAG AATATGCGGC      240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC      300
CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT      360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC      420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAATGAA GACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT      480
GGGGGAAGCT ATGCTTGCAA AAGAGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG      540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA      600
TTTGACAAAT TGTACATTTG GGGGGTTTCC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC      660
CTATATGTTT GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACCTGTA      720
ACCCCGAATA TCGGGTCTAG ACCCTGGGTA AGGGGTGAGT CCAGTAGAAT AAGCATCTAT      780
TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTGATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT      840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC      900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT      960
  
```

TTTCAAATG TAAACAGAAT CACATATGGG GCCTGCCCCA GATATGTTAA GCAAACACT 1020
 CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTCCGGC 1080
 GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC 1140
 AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCAGCAGATC TTAAAAGCAC TCAAGCAGCA 1200
 ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAATCGAGA AAACGAACGA GAAATTCCAT 1260
 CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT 1320
 GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AACGCGGAGC TTCTTGTTGC CCTGGAGAAC 1380
 CAACATACAA TTGATCTAAC TGACTCAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAA AACCAAGGAAG 1440
 CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGCT TCAAAATATA CCACAAATGT 1500
 GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGAACCTTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC 1560
 GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT 1620
 TGGATCCTAT GGATTTCTT TGCCATATCA TGCTTTTTCG TTTGTGTTGT TTTGCTGGGG 1680
 TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC 1740
 AGATCTTAAT TAATTAA 1757

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 15:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 571 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 15 (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Shandong/9/93
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 553
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 15:

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

Asp	Phe	Asn	Trp	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Asp	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Cys
145					150					155					160
Lys	Arg	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	His
				165					170						175
Lys	Leu	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn
			180					185					190		
Gly	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Thr
		195					200					205			
Asp	Ser	Asp	Gln	Thr	Ser	Leu	Tyr	Val	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Thr
	210					215					220				
Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	Gln	Gln	Thr	Val	Thr	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser
225					230					235					240
Arg	Pro	Trp	Val	Arg	Gly	Gln	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr
			245						250					255	
Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Ile	Asp	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu
			260					265					270		
Ile	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	Phe	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Ile
		275					280					285			
Met	Arg	Ser	Asp	Ala	Pro	Ile	Gly	Asn	Cys	Ser	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr
	290					295					300				
Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Arg
305					310					315					320
Ile	Thr	Tyr	Gly	Ala	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys
			325						330					335	
Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile
			340					345					350		
Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val
		355					360					365			
Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln
	370					375				380					
Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly
385					390					395					400
Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile
			405						410					415	
Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
			420					425					430		
Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu
		435					440					445			
Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu
	450					455					460				
Met	Asn	Lys	Leu	Phe	Glu	Lys	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala
465					470					475					480
Glu	Asp	Met	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn
			485						490					495	
Ala	Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu
		515					520					525			
Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser
	530					535					540				
Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys
545					550					555					560
Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile					
			565						570						

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 16:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1814 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

5

- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Shanghai/4/94
- 5 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: líder de ARNm de polihedrina (parcial)
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 10 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para la proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 72
- 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 76 a 81
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 82 a 87
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 73 a 1794
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1804 a 1814
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 16:

TAAAAAACC TATAATAAT GCCCTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60
 GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCGAT CGAATCTGCA CTGGGATAAC ATCTTCAAAC 120
 TCACCTCATG TGGTCAAAAC AGCTACTCAA GGGGAGGTCA ATGTGACTGG TGTGATACCA 180
 CTGACAACAA CACCAACAAA ATCTCATTTT GCAAATCTCA AAGGAACAAA GACCAGAGGG 240
 AAACTATGCC CAAACTGTCT CAACTGCACA GATCTGGATG TGGCCTTGGG CAGACCAATG 300
 TGTGTGGGGA CCACACCTTC GGCAAAAGCT TCAATACTCC ACGAAGTCAG ACCTGTTACA 360
 TCCGGGTGCT TTCCTATAAT GCACGACAGA ACAAAAATCA GACAGCTACC CAATCTTCTC 420
 AGAGGATATG AAAATATCAG ATTATCAACC CAAAACGTTA TCAACGCAGA AAAGGCACCA 480
 GGAGGACCCCT ACAGACTTGG AACCTCAGGA TCTTGCCCTA ACGCTACCAG TAGAAGCGGA 540
 TTTTTGCAA CAATGGCTTG GGCTGTCCCA AGGGACAACA ACAAACAGC AACGAATCCA 600
 CTAACAGTAG AAGTACCATA CATTGACACA AAAGGAGAAG ACCAAATTAC TGTTTGGGGG 660
 TTCCATTCTG ATAACAAACC CCAAATGAAA AACCTCTATG GAGACTCAA TCCTCAAAG 720
 TTCACCTCAT CTGCTAATGG AGTAACCACA CATTATGTTT CTCAGATTGG CGGCTTCCCA 780
 GATCAAACAG AAGACGGAGG GCTACCACAA AGCGGCAGAA TTGTTGTTGA TTACATGGTG 840
 CAAAAACCTG GGAAGACAGG AACCAATTGTC TATCAGAGAG GTGTTTTGTT GCCTCAAAG 900
 GTGTGGTGCG CTAGTGGCAG GAGCAAAGTA ATAAAAGGGT CCTTGCCCTT AATTGGTGAA 960
 GCAGATTGCC TTCACGAAA ATACGGTGGG TTAACAAAA GCAAGCCTTA CTACACAGGA 1020
 GAACATGCAA AAGCCATAGG AAATTGCCCA ATATGGGTGA AAACACCTTT GAAGCTTGCC 1080
 AATGGAACCA AATATAGACC TCCTGCAAAA CTATTAAGG AAAGGGGTTT CTTCCGAGCT 1140
 ATTGCTGGTT TCTTAGAAGG AGGATGGGAA GGAATGATTG CAGGTTGGCA CGGATACACA 1200
 TCTCACGGAG CACATGGAGT GGCAGTGGCA GCAGACCTTA AGAGTACGCA AGAAGCCATA 1260
 AACAAGATAA CAAAAAATCT CAATTCTTTG AGTGAGCTAG AAGTAAAGAA TCTTCAAAG 1320
 CTAAGTGGTG CCATGGATGA ACTCCACAAC GAAATACTCG AGCTGGATGA GAAAGTGGAT 1380
 GATCTCAGAG CTGACACAAT AAGCTCGCAA ATAGAATTG CAGTCTTGCT TTCCAACGAA 1440
 GGAATAATAA ACAGTGAAGA TGAGCATCTA TTGGCACTTG AGAGAAAAC AAAGAAAATG 1500
 CTGGGTCCCT CTGCTGTAGA CATAGGAAAT GGATGCTTCG AAACCAAACA CAAGTGCAAC 1560
 CAGACCTGCT TAGACAGGAT AGCTGCTGGC ACCTTTAATG CGGGAGAATT TTCTCTTCCC 1620
 ACTTTTGATT CACTGAATAT TACTGCTGCA TCTTTAATG ATGATGGATT GGATAACCAT 1680
 ACTATACTGC TCTACTACTC AACTGCTGCT TCTAGTTTGG CGGTAACATT GATGATAGCT 1740
 ATTTTATTG TTTATATGGT CTCCAGAGAC AATGTTTCTT GCTCCATCTG TCTGTGAGGA 1800
 TCTTAATTAA TTAA 1814

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 17:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 592 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- 5 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Shanghai/4/94
- 10 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 574
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 17:

```

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

```

Gly	Val	Thr	Thr	His	Tyr	Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Asp	Gln	
				245					250					255		
Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu	Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	
			260					265					270			
Met	Val	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly	
		275					280					285				
Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys	Val	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	
	290					295					300					
Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro	Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	
305					310				315						320	
Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	
				325					330					335		
Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn	Cys	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys	
			340					345					350			
Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	
		355					360					365				
Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu	
	370					375					380					
Gly	Met	Ile	Ala	Gly	Trp	His	Gly	Tyr	Thr	Ser	His	Gly	Ala	His	Gly	
385					390					395					400	
Val	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	
				405					410					415		
Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	Asn	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	
			420					425					430			
Gln	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala	Met	Asp	Glu	Leu	His	Asn	Glu	Ile	Leu	Glu	
		435					440					445				
Leu	Asp	Glu	Lys	Val	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Gln	
	450					455					460					
Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Ser	Asn	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn	Ser	Glu	
465					470					475					480	
Asp	Glu	His	Leu	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Leu	Gly	
				485					490					495		
Pro	Ser	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Thr	Lys	His	Lys	
			500					505					510			
Cys	Asn	Gln	Thr	Cys	Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala	
		515					520					525				
Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala	
	530					535					540					
Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly	Leu	Asp	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Leu	Tyr	Tyr	
545					550					555					560	
Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Ile	Phe	
				565					570					575		
Ile	Val	Tyr	Met	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Val	Ser	Cys	Ser	Ile	Cys	Leu	
			580					585					590			

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 18:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1802 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de B/Harbin/7/94
- 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: líder de ARNm de polihedrina (parcial)
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para el péptido señal de HA
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 69
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
- (B) LOCALIZACIÓN: 22 a 27
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 70 a 1776
- 5
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1780 a 1785
- 10
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BglII
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1786 a 1791
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1792 a 1802
- 15
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 18:

TAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA 60
 TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA 120
 ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA 180
 AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT 240
 CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT 300
 TCGGCAAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA 360
 ATGCACGACA GAACAAAAT CAGACAGCTA CCCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC 420
 AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAATGCA GAAAAAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT 480
 GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGCTACC AGTAGAAGCG GATTTTTTGC AACRAATGGCT 540
 TGGGCTGTCC CAAGGGACGA CAACAAAACA GCAACGAATC CACTAACAGT AGAAGTACCA 600
 TACGTTTGTA CAGAAGGAGA AGACCAAATT ACTGTTTGGG GGTTCATTTC TGATAACAAA 660
 GCCCAAATGA AAAACCTCTA TGGAGACTCA AATCCTCAA AGTTCACCTC ATCTGCTAAT 720
 GGAGTAACCA CACATTATGT TTCTCAGATT GCGCGCTTCC CAGATCAAAC AGAAGACGGA 780
 GGGCTACCAC AAAGCGGCAG AATTGTTGTT GATTACATGG TGCAAAAACC TGGGAAAACA 840
 GGAACAATTG TCTATCAAAG AGGTGTTTTG TTGCCTCAA AGGTGTGGTG CGCGAGTGCC 900
 AGGAGCAAAG TAATAAAAGG GTCCTTGCCT TTAATTGGTG AAGCAGATTG CCTTCACGAA 960
 AAATACGGTG GATTAAACAA AAGCAAGCCT TACTACACAG GAGAACATGC AAAAGCCATA 1020
 GGAAATTGCC CAATATGGGT GAAAACACCT TTGAAGCTTG CCAATGGAAC CAAATATAGA 1080
 CCTCCTGCAA AACTATTAAA GGAAAGGGT TTCTTCGGAG CTATTGCTGG TTTCTTAGAA 1140
 GGAGGATGGG AAGGAATGAT TGCAGGTTGG CACGGATACA CATCTCACGG AGCACATGGA 1200
 GTGGCAGTGG CAGCAGACCT TAAGAGTACG CAAGAAGCCA TAAACAAGAT AACAAAAAAT 1260
 CTCAATTCTT TGAGTGAGCT AGAAGTAAAG AATCTTCAA GACTAAGTGG TGCCATGGAT 1320
 GAACTCCATA ACGAAATACT CGAGCTGGAT GAGAAAGTGG ATGATCTCAG AGCTGACACT 1380
 ATAAGCTCGC AAATAGAACT TGCAGTCTTG CTTTCCAACG AAGGAATAAT AACACAGTGAA 1440
 GATGAGCATC TATTGGCACT TGAGAGAAAA CTAAGAAAA TGCTGGGTCC CTCTGCTGTA 1500
 GACATAGGGA ATGGATGCTT CGAAACCAA CACAAGTGCA ACCAGACCTG CTTAGACAGG 1560
 ATAGCTGCTG GCACCTTTAA TGCAGGAGAA TTTTCTCTCC CCACTTTTGA TTTACTGAAT 1620
 ATTACTGCTG CATCTTTAAA TGATGATGGA TTGGATAATC ATACTATACT GCTCTACTAC 1680
 TCAACTGCTG CTTCTAGTTT GGCTGTAACA TTGATGATAG CTATTTTTAT TGTTTTATATG 1740
 GTCTCCAGAG ACAATGTTTC ATGCTCCATC TGTCTGTGAG GTACCAGATC TTAATTAATT 1800
 AA 1802

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 586 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de B/Harbin/7/94
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: péptido señal de HA
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 17
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 (B) LOCALIZACIÓN: 18 a 569
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 19:

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

Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn
305					310					315					320
Lys	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn
				325					330					335	
Cys	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys	Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys
			340					345					350		
Tyr	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ala
		355						360				365			
Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile	Ala	Gly	Trp
	370					375					380				
His	Gly	Tyr	Thr	Ser	His	Gly	Ala	His	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Asp
385					390					395					400
Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	Asn
				405					410					415	
Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala
			420					425					430		
Met	Asp	Glu	Leu	His	Asn	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Val	Asp
		435					440					445			
Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Leu
	450					455					460				
Leu	Ser	Asn	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn	Ser	Glu	Asp	Glu	His	Leu	Leu	Ala
465					470					475					480
Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Leu	Gly	Pro	Ser	Ala	Val	Asp	Ile
				485					490					495	
Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Thr	Lys	His	Lys	Cys	Asn	Gln	Thr	Cys	Leu
			500					505					510		
Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro
		515					520					525			
Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly
	530					535					540				
Leu	Asp	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser
545					550					555					560
Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Ile	Phe	Ile	Val	Tyr	Met	Val	Ser
				565					570					575	
Arg	Asp	Asn	Val	Ser	Cys	Ser	Ile	Cys	Leu						
			580					585							

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 20:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1757 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Johanesburgo/33/94
- 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: líder de ARNm de polihedrina (parcial)
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para la proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 72
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción SmaI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 76 a 81
- 25 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: región que codifica para rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 73 a 1731
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción KpnI
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1735 a 1740
- 30 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio de restricción BgIII
- (B) LOCALIZACIÓN: 1741 a 1747
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: señal universal de terminación de la traducción
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1741 a 1757
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 20:

5

TAAAAAACCC	TATAAATAAT	GCCCTTGTAC	AAATTGTTAA	ACGTTTTGTG	GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG	CGATTCCCAG	GCAGGACCTT	CCAGGAAATG	ACAACAGCAC	AGCAACGCTG	120
TGCCTGGGAC	ACCATGCAGT	GCCAAACGGA	ACGCTAGTGA	AAACAATCAC	GAATGATCAA	180
ATTGAAGTGA	CTAATGCTAC	TGAGCTGGTT	CAGAGTTCCC	CAACAGGTAG	AATATGCGAC	240
AGTCCTCACC	GAATCCTTGA	TGGAAAGAAC	TGCACACTGA	TAGATGCTCT	ATTGGGAGAC	300
CCTCATTGTG	ATGGCTTCCA	AAATAAGGAA	TGGGACCTTT	TTGTTGAACG	CAGCAAAGCT	360
TACAGCAACT	GTTACCCTTA	TGATGTGCCG	GATTATGCCT	CCCTTAGGTC	ACTAGTTGCC	420
TCATCAGGCA	CCCTGGAGTT	TATCAACGAA	AACCTCAATT	GGACTGGAGT	CGCTCAGGAT	480
GGGAAAAGCT	ATGCTTGCAA	AAGGGGATCT	GTTAACAGTT	TCTTTAGTAG	ATTGAATTGG	540
TTGCACAAAT	TAGAATACAA	ATATCCAGCG	CTGAACGTGA	CTATGCCAAA	CAATGGCAAA	600
TTTGACAAAT	TGTACATTTG	GGGGGTTTCC	CACCCGAGCA	CGGACAGTGA	CCAAACCAGC	660
CTATATGTCC	GAGCATCAGG	GAGAGTCACA	GTCTCTACCA	AAAGAAGCCA	ACAAACTGTA	720
ATCCCGGATA	TCGGGTATAG	ACCATGGGTA	AGGGGTCAGT	CCAGTAGAAT	AGGCATCTAT	780
TGGACAATAG	TAAAACCGGG	AGACATACTT	TTGATTAATA	GCACAGGGAA	TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT	ACTTCAAAAT	ACGAAATGGG	AAAAGCTCAA	TAATGAGGTC	AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT	GCAGTTCTGA	ATGCATCACT	CCAAATGGAA	GCATTCCCAA	TGACAAACCT	960
TTTCAAAATG	TAAACAGGAT	CACATATGGG	GCCTGCCCCA	GATATGTTAA	GCAAAACACT	1020
CTGAAATTGG	CAACAGGGAT	GCGGAATGTA	CCAGAGAAAC	AAACTAGAGG	CATATTCGGC	1080
GCAATCGCAG	GTTTCATAGA	AAATGGTTGG	GAGGGAATGG	TAGACGGTTG	GTACGGTTTC	1140
AGGCATCAAA	ATTCTGAGGG	CACAGGACAA	GCTGCAGATC	TTAAAAGCAC	TCAAGCAGCA	1200
ATCGACCAAA	TCAACGGGAA	ACTGAATAGG	TTAGTCGAGA	AAACGAACGA	GAAATTCCAT	1260
CAAATCGAAA	AAGAATTCTC	AGAAGTAGAA	GGGAGAATTC	AGGACCTCGA	GAAATATGTT	1320
GAAGACACTA	AAATAGATCT	CTGGTCTTAC	AATGCGGAGC	TTCTTGTTGC	TCTGGAGAAC	1380
CAACATACAA	TTGATCTAAC	TGACTCAGAA	ATGAACAAAC	TGTTTGAAAG	AACAAGGAAG	1440
CAACTGAGGG	AAAATGCTGA	GGACATGGGC	AATGGTTGTT	TCAAAATATA	CCACAAATGT	1500
GACAATGCCT	GCATAGGGTC	AATCAGAAAT	GGAACCTTATG	ACCATGATGT	ATACAGAGAC	1560
GAAGCATTAA	ACAACCGGTT	CCAGATCAAA	GGTGTGAGC	TGAAGTCAGG	ATACAAAGAT	1620
TGGATTCTAT	GGATTTCTTT	TGCCATATCA	TGCTTTTTTGC	TTTGTGTTGT	TTTGCTTGGG	1680
TTTCATCATGT	GGGCTGCCA	AAAAGGCAAC	ATTAGGTGCA	ACATTTGCAT	TTGAGGTACC	1740
AGATCTTAAT	TAATTAA					1757

- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID N°: 21:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 571 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 - (iii) HIPOTÉTICA: NO
 - (iv) ANTISENTIDO: NO
 - (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 - (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 10
- (A) ORGANISMO: Virus de la gripe
 - (C) ELEMENTO AISLADO INDIVIDUAL: rHA de A/Johanesburgo/33/94
 - (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: secuencia de proteína señal de 61K de AcNPV
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1 a 18
- 15
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: rHA madura
 - (B) LOCALIZACIÓN: 19 a 569
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 21:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Pro	Gly	Asn	Asp	Asn	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Thr	Leu	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Lys
		35					40					45			
Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Val
	50					55					60				
Gln	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Arg	Ile	Cys	Asp	Ser	Pro	His	Arg	Ile	Leu
65					70					75					80
Asp	Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	His
				85					90					95	
Cys	Asp	Gly	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Trp	Asp	Leu	Phe	Val	Glu	Arg	Ser
			100					105					110		
Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser
		115					120					125			
Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu
	130					135					140				
Asn	Phe	Asn	Trp	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Asp	Gly	Lys	Ser	Tyr	Ala	Cys
145					150					155					160
Lys	Arg	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	His
				165					170					175	
Lys	Leu	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn
			180					185					190		
Gly	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Thr
		195					200					205			
Asp	Ser	Asp	Gln	Thr	Ser	Leu	Tyr	Val	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Thr
	210					215					220				
Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	Gln	Gln	Thr	Val	Ile	Pro	Asp	Ile	Gly	Tyr
225						230				235					240
Arg	Pro	Trp	Val	Arg	Gly	Gln	Ser	Ser	Arg	Ile	Gly	Ile	Tyr	Trp	Thr
				245					250					255	
Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu
			260					265					270		
Ile	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	Phe	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Ile
		275					280					285			
Met	Arg	Ser	Asp	Ala	Pro	Ile	Gly	Asn	Cys	Ser	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr
	290					295					300				
Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Arg
305					310					315					320
Ile	Thr	Tyr	Gly	Ala	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys
				325					330					335	
Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile
				340					345				350		
Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val
		355					360					365			

Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln
	370					375					380				
Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly
385					390					395					400
Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile
				405					410					415	
Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
			420					425					430		
Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu
		435					440					445			
Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu
	450					455					460				
Met	Asn	Lys	Leu	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala
465					470					475					480
Glu	Asp	Met	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn
				485					490					495	
Ala	Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu
		515					520					525			
Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser
	530				535						540				
Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys
545					550					555					560
Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile					
				565					570						

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 22:

TGGTTGGTCG CCGTTTCTAA CGCGATTCCC GGGGGTACC

39

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 23:

Trp Leu Val Ala Val Ser Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr
1 5 10

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 24:

TGGTTAGTCG CCGTGTCTCG CAGGCCAGAG AGGCCTTGGT ACC

43

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 25:
GTCCCGTGT CCAACGCG 18
- 5 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 26:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 18 pares base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 10 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 26:
TAATTGGCCA GAGAGGCC 18
- 15 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 27:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 39 pares base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 27:
GGGGGATCCG GTACCAGCAA AAGCAGGGGA TAATTCTAT 39
- 25 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 28:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 38 bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 28:
GGGGGTACCC CCGGGGACTT TCCAGGAAAT GACAACAG 38
- 35 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 29:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 44 bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 29:
CCCGGTACCG AATCATCCTA GAAACAAGGG TGTTTTTAAT TAAT 44
- 45 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 30:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 47 bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 30:
GGGGAATTCTG GTACCCCGG GAAGGCAATA ATTGTACTAC TCATGGT 47
- 55 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 31:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 36 bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 31:
- (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID Nº: 32:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 50 bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 32:

5

GGGGAATTCG GATCCGGTAC CTCACAGACA GATGGARCAA GAAACATTGT

50

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para fabricar la proteína de fusión de hemaglutinina, método que comprende infectar células de insecto cultivadas con un vector que contiene las siguientes secuencias en orden 5' -> 3': un promotor de polihedro procedente de un baculovirus, un codón de inicio de la traducción ATG, una secuencia que codifica para un péptido señal de quitinasa, la secuencia que codifica para hemaglutinina procedente de una cepa de gripe A y una cepa de gripe B, una secuencia que codifica para la segunda proteína, un codón de terminación de la traducción, y una señal de poliadenilación de ARN de polihedro; y cultivar las células en un medio nutriente, en el que el péptido señal de quitinasa comprende los aminoácidos TRP LEU VAL ALA VAL SER ASN ALA, o la secuencia que codifica el péptido señal de quitinasa comprende los nucleótidos TGG TTG GTC GCC GTT TCT AAC GCG.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1 que además comprende aislar la proteína de fusión de hemaglutinina de gripe a partir de células con una pureza de al menos 95%.
- 15 3.- El método de la reivindicación 2, en el que se aísla una proteína de fusión de hemaglutinina glicosilada madura separando las proteínas ligadas a la membrana, que incluyen la proteína de fusión de hemaglutinina glicosilada madura procedente de proteínas que no son de membrana a pH alcalino, lavar las proteínas ligadas a membrana para eluir la proteína de fusión de hemaglutinina glicosilada madura, separar la proteína de fusión de hemaglutinina glicosilada madura eluída mediante una resina de intercambio aniónico con un cambio del pH, y separar la proteína de fusión de hemaglutinina glicosilada madura pasada por intercambio aniónico mediante una resina de intercambio catiónico con un cambio en la concentración salina.
- 20 4.- Un método para fabricar un vector que contiene las siguientes secuencias 5' -> 3': un promotor de polihedrina procedente de un baculovirus, un codón de inicio de la traducción ATG, una secuencia que codifica para un péptido señal de quitinasa, las secuencias codificadoras procedentes de hemaglutinina de una cepa de gripe seleccionada del grupo que consiste en cepas de gripe A y en cepas de gripe B, un codón de terminación de la traducción, y una señal de poliadenilación de ARN de polihedro; que comprende recolectar el virus del medio celular y aislar el ARN vírico, para las cepas de gripe A, o el ARNm vírico, para las cepas de gripe B;
- 25 sintetizar ADNc usando un cebador universal (5' AGCAAAAGCAGG-3' (SEC ID N°: 1)) para el ARN vírico de las cepas de gripe A o cebadores aleatorios para el ARNm de las cepas de gripe B, en donde los cebadores 5' y 3' presentan sitios de enzimas de restricción en los extremos que no se dan en los genes de hemaglutinina; amplificar los cebadores de gripe A ó B y el ADNc de gripe mezclado con los segmentos de gen de hemaglutinina para producir fragmentos de ADN de cadena doble que contengan secuencias codificadoras de hemaglutinina madura completa;
- 30 identificar el péptido señal de los genes de hemaglutinina y entonces amplificar los genes de hemaglutinina menos el péptido señal; y clonar los genes de hemaglutinina menos el péptido señal en un vector que contiene el promotor de polihedro de AcNPV y la secuencia que codifica para el péptido señal de quitinasa, comprendiendo el péptido señal de quitinasa los aminoácidos TRP LEU VAL ALA VAL SER ASN ALA o la secuencia codificadora de péptido señal de quitinasa comprende los nucleótidos TGG TTG GTC GCC GTT TCT AAC GCG.
- 35 5.- El método de la reivindicación 4, en el que los genes de hemaglutinina son clonados en el vector usando PCR de tal modo que el vector codifica el péptido señal acoplado directamente a la hemaglutinina sin ningún aminoácido interviniente.
- 40 6.- El método de la reivindicación 4, que además comprende transfectar el vector en células de insecto, y seleccionar células para la expresión de hemaglutinina.
- 45 7.- Una proteína de fusión de hemaglutinina de gripe recombinante expresada en un sistema de expresión de baculovirus cultivada en células de insecto obtenible mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y purificada hasta al menos el 95%.
- 8.- Una composición de vacuna que comprende la proteína de fusión de hemaglutinina de gripe recombinante de acuerdo con la reivindicación 7.
- 50 9.- La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la segunda proteína se selecciona del grupo que consiste en una proteína vírica de hepatitis B, una proteína de VIH, un antígeno carcinoembrionario y una neuraminidasa.
- 10.- La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la cepa de gripe infecta a humanos.
- 11.- La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, que además comprende
- 55 (i) un vehículo farmacéuticamente aceptable, o
(ii) un adyuvante, o
(iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable y un adyuvante.

12.- La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sistema de administración polimérico.

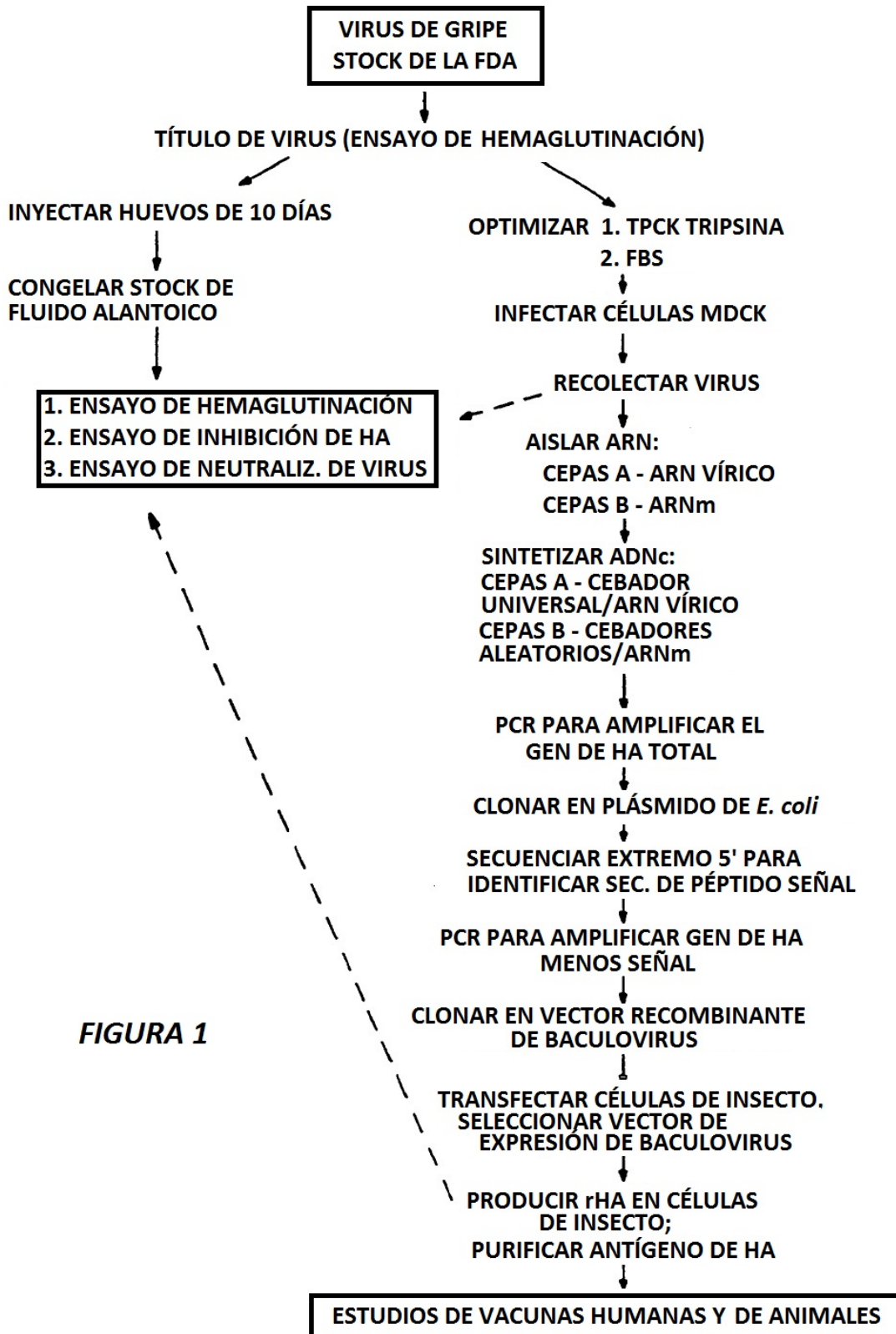
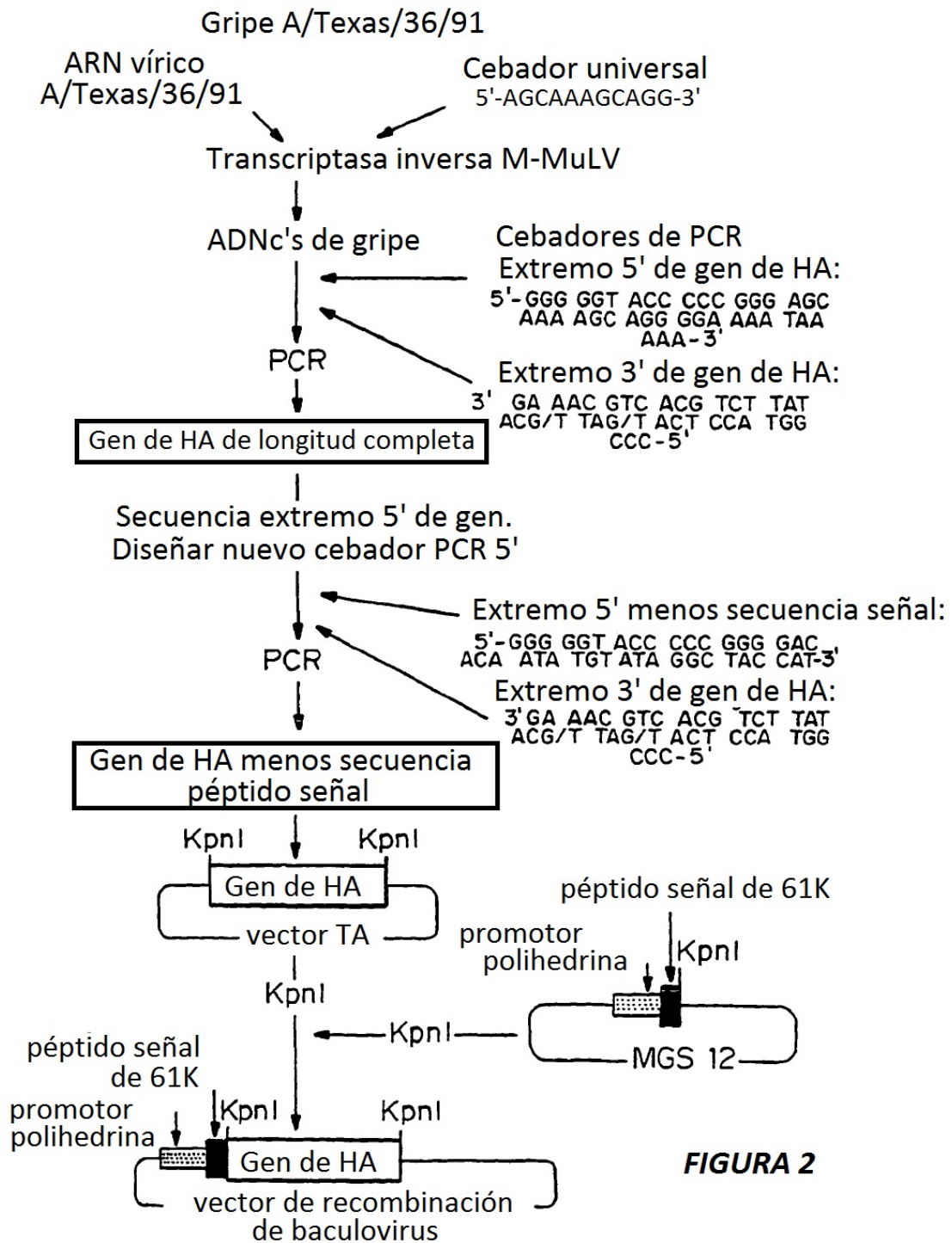


FIGURA 1



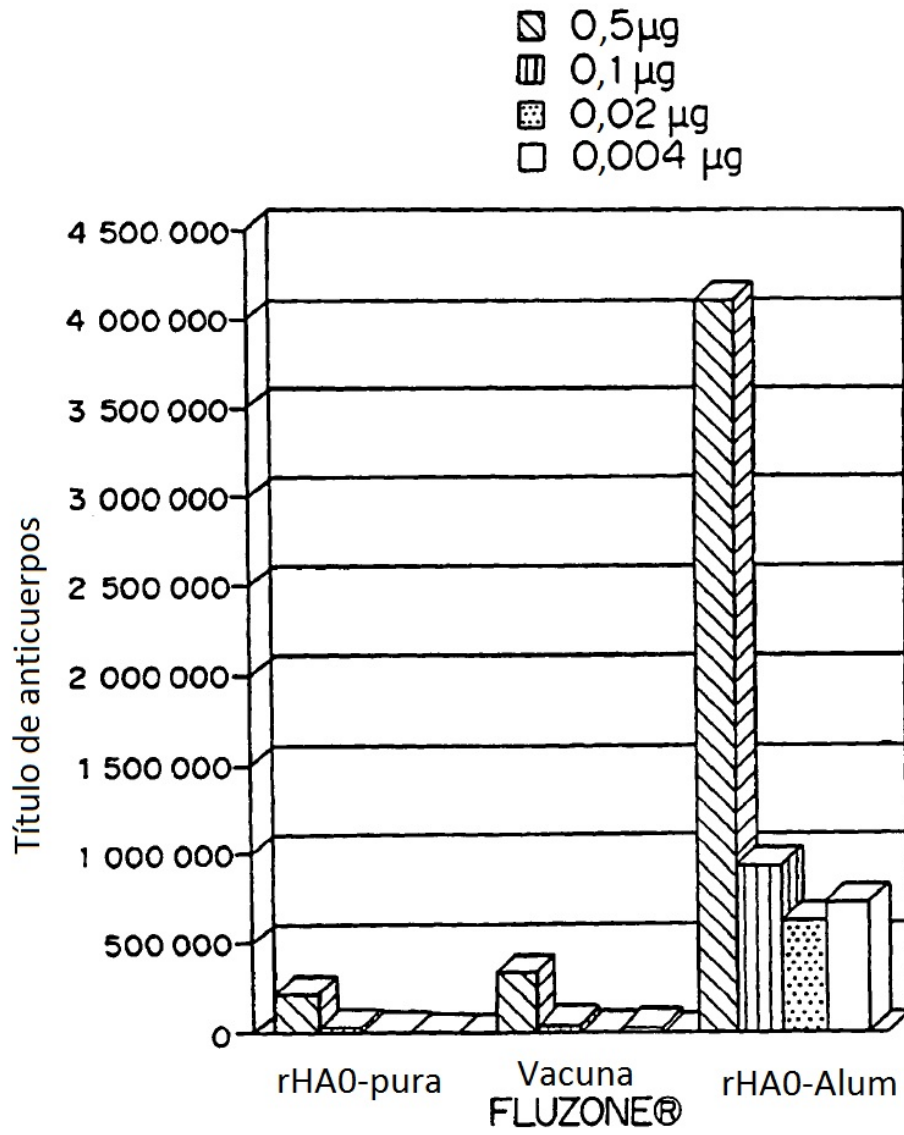


FIGURA 3

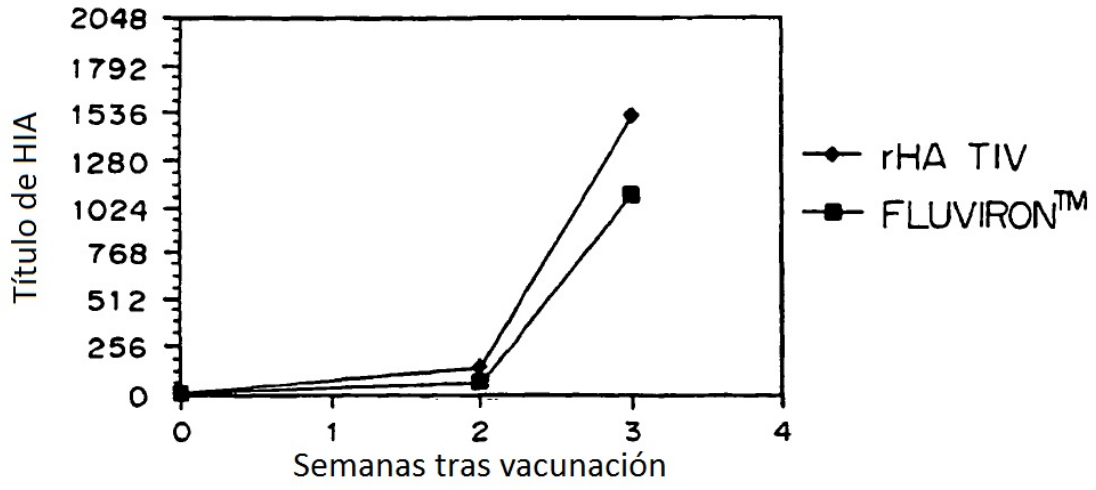


FIGURA 4a

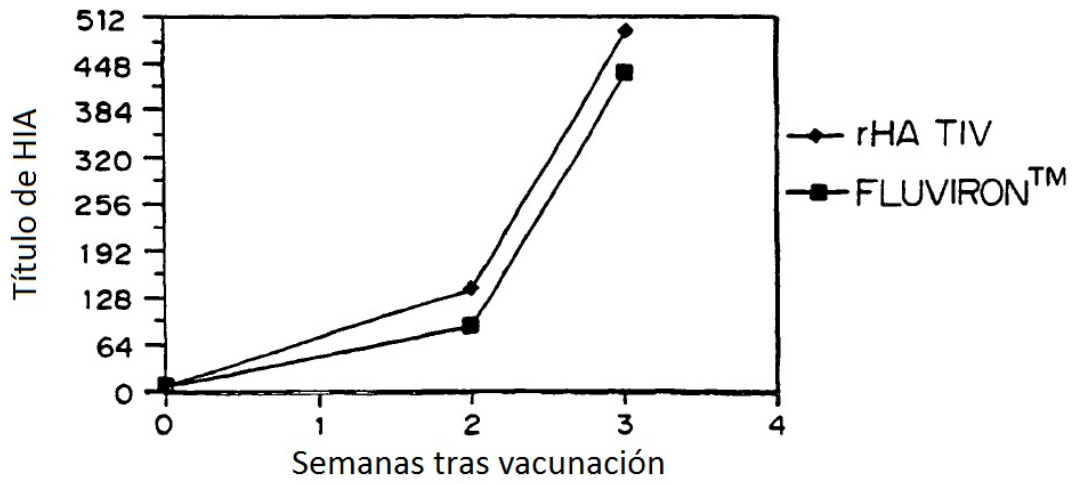


FIGURA 4b

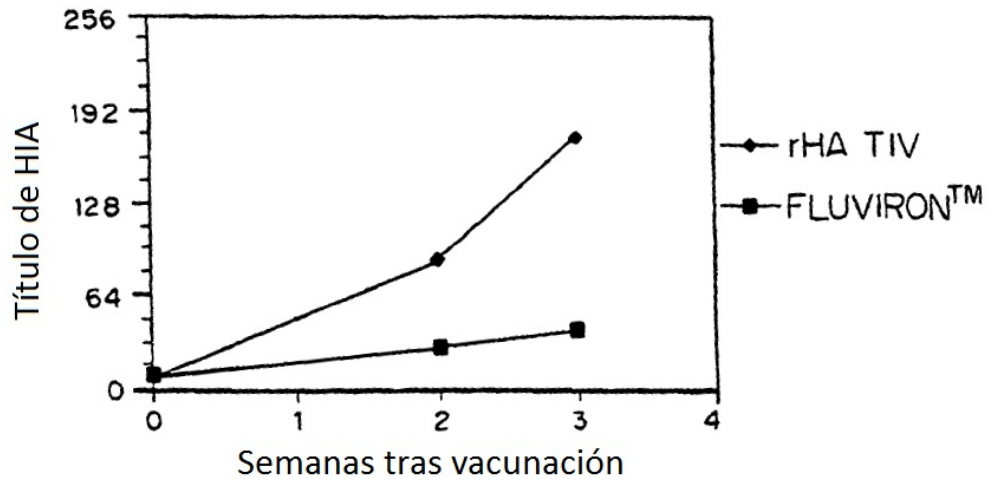


FIGURA 4c