

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 492**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05751982 .9**

96 Fecha de presentación: **20.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1766059**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

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

30 Prioridad:

25.05.2004 US 574553 P

28.02.2005 US 657554 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (50.0%)

One MedImmune Way

Gaithersburg, MD 20878 y

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF

AMERICA NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH

(50.0%)

72 Inventor/es:

YANG, CHIN-FEN;

KEMBLE, GEORGE;

SUBBARAO, KANTA y

MURPHY, BRIAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 393 492 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de hemaglutinina y neuraminidasa de influenza.

Antecedentes de la invención

5 Las vacunas contra diversas cepas en evolución de influenza son importantes desde un punto de vista de salud pública, así como comercialmente, puesto que cada año numerosos individuos se infectan con diferentes cepas y tipos de virus influenza. Los lactantes, ancianos y aquellos que tienen una atención sanitaria inadecuada y personas inmunocomprometidas corren un riesgo especial de muerte por tales infecciones. El problema de las infecciones por influenza se agrava porque las cepas de influenza novedosas evolucionan rápidamente y pueden propagarse entre diversas especies, necesitando de ese modo la producción continua de nuevas vacunas.

10 Se han producido numerosas vacunas que pueden producir una respuesta inmunitaria protectora específica para tales cepas de virus/virus influenza diferentes durante más de 50 años e incluyen vacunas de virus completo, vacunas de virus dividido, vacunas de antígeno de superficie y vacunas de virus atenuado vivo. Sin embargo, aunque formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacunas pueden producir una respuesta inmunitaria sistémica, las vacunas de virus atenuado vivo tienen la ventaja de también poder estimular la inmunidad mucosa local en el aparato respiratorio. Se ha realizado un considerable trabajo por los presentes inventores y colaboradores en la producción de virus influenza, y fragmentos de los mismos, para la producción de vacunas; véanse, por ejemplo, los documentos US 2004 029251 y US 2005 042229.

15 Debido a la continua aparición (o reaparición) de cepas de influenza diferentes, se desean continuamente nuevas vacunas contra influenza. Normalmente, tales vacunas se crean usando restos antigénicos de las cepas de virus recién aparecidas, por tanto, se desean altamente polipéptidos y polinucleótidos de cepas de virus novedosas, recién aparecidas o recién reaparecidas (especialmente secuencias de genes antigénicos).

20 El documento por Subbarao K *et al* (2003), *Virology*, vol. 305, págs. 192-200 describe la evaluación de un candidato a vacuna contra el virus influenza A H5N1 reagrupado genéticamente modificado.

25 El documento por Li S *et al* (1999), *J. Infect. Dis.*, vol. 179, págs. 1132-1138 describe virus influenza con reagrupamiento 6:2 como vacunas candidatas para los virus A/Hong Kong/97 (H5N1) humanos patógenos.

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

Sumario de la invención

30 La invención en su sentido más amplio es tal como se define en las reivindicaciones independientes. Se describe en el presente documento un polipéptido aislado o recombinante que se selecciona de: los polipéptidos codificados por una cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:10; uno cualquiera de los polipéptidos codificados por SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:10; uno cualquiera de los polipéptidos de SEQ ID NO:11 a SEQ ID NO:20; sólo los marcos de lectura abiertos de los polipéptidos de SEQ ID NO:11 de SEQ ID NO:20; formas alternativas (por ejemplo, la forma madura sin el péptido señal, o sin las secuencias 5' y 3' fuera del marco de lectura abierto, o las secuencias tal como se expresan en la superficie de un virus (por ejemplo, influenza)) de los polipéptidos de SEQ ID NO:11-20. Los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden opcionalmente proteínas de fusión, proteínas con una secuencia líder, un polipéptido precursor, proteínas con una señal de secreción o una señal de localización, o proteínas con una etiqueta de epítipo, una etiqueta de E o una etiqueta de epítipo de His. Las secuencias descritas en el presente documento también se muestran en el apéndice 1 y en las listas de secuencias en el presente documento. Las secuencias de hemaglutinina descritas en el presente documento comprenden secuencias con sitios de escisión polibásicos modificados (que permiten de ese modo el crecimiento de los virus en huevos). Las secuencias de polipéptido de hemaglutinina de SEQ ID NOS:11-20 comprenden las secuencias de péptido señal amino terminal endógenas, sin embargo, las secuencias de polipéptido de hemaglutinina descritas en el presente documento también incluyen la forma madura (péptido señal amino terminal escindido) de los polipéptidos de hemaglutinina. Los sitios de escisión de cualquier secuencia de polipéptido de hemaglutinina de cualquier cepa de influenza pueden predecirse o medirse rutinariamente usando cualquiera de varios métodos en la técnica.

35 También se describe en el presente documento una composición con uno o más polipéptidos enumerados anteriormente, o fragmentos de los mismos. Se describen además en el presente documento polipéptidos a los que se une específicamente un antisuero policlonal generado contra al menos 1 antígeno que comprende al menos una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente, o un fragmento de la misma. Tales anticuerpos específicos para los polipéptidos descritos anteriormente también se describen en el presente documento. Los polipéptidos descritos en el presente documento son opcionalmente inmunogénicos.

40 Se describen además composición inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de uno o más de cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente así como métodos para estimular el sistema inmunitario de un individuo para producir una respuesta inmunitaria protectora contra virus influenza administrando

al individuo una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos anteriores en un vehículo fisiológicamente aceptable.

La invención incluye virus influenza recombinante tal como se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas que comprende uno o más de los polipéptidos o polinucleótidos anteriores, además de composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de tal virus influenza recombinante. El virus influenza recombinante de la invención para su uso para estimular el sistema inmunitario de un individuo para producir una respuesta inmunitaria protectora contra virus influenza, a través de la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de tal virus influenza recombinante en un vehículo fisiológicamente aceptable también es parte de la invención.

También se describe en el presente documento una composición de materia que tiene dos o más ácidos nucleicos descritos anteriormente (por ejemplo, una biblioteca que comprende al menos aproximadamente 2, 5, 10, 50 o más ácidos nucleicos). Tales composiciones pueden producirse opcionalmente escindiendo uno o más ácido(s) nucleico(s) descrito(s) anteriormente, (por ejemplo, de manera mecánica, química, enzimática con una endonucleasa de restricción/ARNasa/ADNasa, etc.). Otras composiciones incluyen, por ejemplo, composiciones producidas incubando uno o más de los ácido(s) nucleico(s) descrito(s) anteriormente en presencia de desoxirribonucleótidos trifosfato y un ácido nucleico polimerasa termoestable.

También se describen en el presente documento células que comprenden al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente, o un producto o fragmento amplificado o escindido de los mismos. Tales células pueden expresar opcionalmente un polipéptido codificado por tal ácido nucleico. Se describen además en el presente documento vectores (por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, fragmentos de virus, etc.) que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Tales vectores pueden comprender opcionalmente un vector de expresión. Los vectores de expresión preferidos incluyen, pero no se limitan a, vectores que comprenden el promotor de pol I y secuencias terminadoras o vectores que usan los promotores tanto de pol I como de pol II "el sistema de promotores de pol I/pol II" (por ejemplo, Zobel *et al.*, Nucl. Acids Res. 1993,21:3607; documento US20020164770; Neumann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor *et al.*, J. Virol. 1999, 73:9679; y documento US20030035814). También se describen células transducidas por tales vectores.

En algunas realizaciones, la invención abarca un virus (por ejemplo, un virus influenza) que comprende uno o más ácidos nucleicos descritos anteriormente (por ejemplo, que codifican para hemaglutinina y/o neuraminidasa) tal como se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas. Composiciones inmunogénicas que comprenden tal virus también son parte de la presente invención tal como se caracteriza mediante las reivindicaciones adjuntas. Un virus de este tipo es un virus con reagrupamiento 6:2 (por ejemplo, que comprende 6 regiones codificantes de genes que codifican para segmentos de genoma internos de A/AA/6/60 que codifican para una hemaglutinina que comprende SEQ ID NO. 45 y codificada por SEQ ID NO. 5 y una neuraminidasa que comprende SEQ ID NO. 16). Un virus influenza reagrupado de la invención incluye un virus influenza con reagrupamiento 6:2, comprendiendo dicho virus 6 regiones codificantes de genes que codifican para segmentos de genoma internos de A/Ann Arbor/6/60 y 2 regiones codificantes de genes, en el que las 2 regiones codificantes de genes son HA que comprende SEQ ID NO. 15 y codificada por SEQ ID NO. 5 o NA que comprende SEQ ID NO. 16. Métodos tal como se caracterizan mediante las reivindicaciones adjuntas de producción de virus influenza recombinante a través del cultivo de una célula huésped que alberga un virus influenza en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico y el aislamiento del virus influenza recombinante de una o más de la(s) célula(s) huésped o el medio también son parte de la invención.

En otras realizaciones en el presente documento, la invención comprende composiciones inmunogénicas que tienen una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de los virus influenza recombinantes descritos anteriormente tal como se caracterizan mediante las reivindicaciones adjuntas. Otras realizaciones incluyen el virus influenza reagrupado de la invención para su uso en métodos para estimular el sistema inmunitario de un individuo para producir una respuesta inmunitaria protectora contra virus influenza administrando al individuo una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de los virus influenza recombinantes descritos anteriormente (opcionalmente en un vehículo fisiológicamente eficaz).

También se describen en el presente documento métodos de producción de un polipéptido aislado o recombinante cultivando cualquier célula huésped anterior, en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de ácido nucleico, y aislando el polipéptido de una o más de las células huésped o el medio en el que se hacen crecer las células.

Composiciones inmunogénicas tal como se caracterizan mediante las reivindicaciones adjuntas también son características de la invención. Por ejemplo, composiciones inmunogénicas que comprenden uno cualquiera o más virus descritos anteriormente tal como se caracterizan mediante las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, junto con uno o más componente(s) de administración farmacéuticamente aceptables.

El virus influenza reagrupado de la invención para su uso en un método de tratamiento profiláctico de una infección viral (por ejemplo, gripe viral) en un sujeto a través de la administración de uno cualquiera o más virus descritos anteriormente o composiciones inmunogénicas tal como se mencionan en las reivindicaciones en una cantidad

eficaz para producir una respuesta inmunogénica contra la infección viral también es parte de la presente invención. Los sujetos para tal tratamiento pueden incluir mamíferos (por ejemplo, seres humanos). Tal virus reagrupado de la invención para su uso en tales métodos también puede ser para la administración *in vivo* al sujeto así como para la administración *in vitro* o *ex vivo* a una o más célula(s) del sujeto. Adicionalmente, tal virus reagrupado de la invención para su uso en tales métodos también puede comprender una composición del virus y un excipiente farmacéuticamente aceptable para su administración al sujeto en una cantidad eficaz para tratar profilácticamente la infección viral.

También se describen en el presente documento composiciones de materia que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos de hemaglutinina y/o neuraminidasa de una o más cepa(s) de influenza pandémica(s) y secuencias de ácido nucleico que codifican para uno o más polipéptido(s) de A/Ann Arbor/6/60. Se describen además composiciones de materia que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos de hemaglutinina y/o neuraminidasa de una o más cepa(s) de influenza pandémica(s) y secuencias de ácido nucleico que codifican para uno o más polipéptido(s) de PR8 o A/Ann Arbor/6/60. Tales secuencias pueden incluir las enumeradas en la lista de secuencias en el presente documento. Adicionalmente, estas composiciones incluyen composiciones de materia que comprende secuencias que codifican para hemaglutinina y/o neuraminidasa de una o más cepa(s) de influenza pandémica(s) y secuencias de ácido nucleico que codifican para una cepa de estructura principal seleccionada en un reagrupamiento 6:2. Tales composiciones descritas en el presente documento incluyen secuencias que codifican para la hemaglutinina y neuraminidasa seleccionada de la lista de secuencias en el presente documento y una cepa de estructura principal, siendo la cepa de estructura principal PR8 o A/Ann Arbor/6/60. También se describen composiciones tal como se describió anteriormente en las que la hemaglutinina comprende un sitio de escisión polibásico modificado. La invención también incluye una vacuna contra influenza atenuada viva que comprende tales composiciones anteriores tal como se caracterizan mediante las reivindicaciones adjuntas.

Estos y otros objetos y características de la invención resultarán más completamente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada conjuntamente con el apéndice y las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

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

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

Figura 3: Ilustra que los candidatos a vacuna H5N1/AA *ca* no son letales para ratones.

Figura 4: Ilustra que los virus reagrupados H5N1 *ca* 1997 y 2004 están restringidos en la replicación en ratones.

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

Figura 6: Muestra los títulos de Ac HAI séricos producidos en ratones tras una única dosis i.n. de vacuna.

Figura 7: Muestra los títulos de Ac neutralizantes séricos producidos en ratones tras una única dosis i.n. de vacuna.

Figura 8: Ilustra que virus reagrupados H5N1 *ca* protegen a ratones de exposiciones letales con 50, 500 o 5000 DL₅₀ de virus H5N1 de tipo natural.

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

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

Figura 11: Ilustra la eficacia de protección conferida por la vacuna H5N1 *ca* 2004 frente a la exposición a alta dosis (10₅DICT₅₀) con virus wt H5N1 homólogos o heterólogos en ratones.

Figura 12: Ilustra la eficacia de protección conferida por las vacunas H5N1 *ca* 1997 y 2003 frente a exposiciones a alta dosis (10₅DICT₅₀) con virus de tipo natural H5N1 homólogos o heterólogos en ratones.

Figura 13: Ilustra la eficacia de protección conferida por la vacuna H5N1 *ca* 2004 frente a dosis bajas o altas de exposiciones a virus de tipo natural H5N1 homólogos en ratones.

Descripción detalladaDEFINICIONES

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que se refiere la invención. Las siguientes definiciones complementan aquéllas en la técnica y se refieren a la presente solicitud y no deben atribuirse necesariamente a ningún caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a ninguna solicitud o patente de propiedad conjunta. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica para someter a prueba la presente invención, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferidos. Por consiguiente, la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares sólo, y no pretende ser limitativa.
- 5 Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un virus” incluye una pluralidad de virus; la referencia a una “célula huésped” incluye mezclas de células huésped y similares.
- 10 Una “secuencia de aminoácidos” es un polímero de residuos de aminoácido (una proteína, polipéptido, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero de aminoácidos, dependiendo del contexto.
- 15 Los términos “ácido nucleico”, “polinucleótido”, “secuencia de polinucleótido” y “secuencia de ácido nucleico” se refieren a polímeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, quimeras o análogos de los mismos, o una cadena de caracteres que representan tales, dependiendo del contexto. Tal como se usa en el presente documento, el término incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos que se producen de manera natural que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales porque hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a nucleótidos que se producen de manera natural (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular abarca opcionalmente secuencias complementarias además de la secuencia explícitamente indicada. A partir de cualquier secuencia de polinucleótido especificada, puede determinarse o bien el ácido nucleico dado o bien la secuencia de polinucleótido complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).
- 20 El término “ácido nucleico” o “polinucleótido” también abarca cualquier cadena física de unidades de monómero que puede hacerse corresponder con una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero de ADN o ARN típico), PNA, oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas para ADN o ARN biológico en disolución, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados) y similares. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario o bicatenario.
- 25 Una “subsecuencia” es cualquier parte de una secuencia entera, hasta e incluyendo la secuencia completa. Normalmente, una subsecuencia comprende menos de la secuencia de longitud completa. Una “subsecuencia única” es una subsecuencia que no se encuentra en ninguna secuencia de polinucleótido o polipéptido de influencia determinada previamente.
- 30 El término “variante” con respecto a un polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada en uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios “conservativos”, cuando un aminoácido sustituido tiene propiedades químicas o estructurales similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. Alternativamente, una variante puede tener cambios “no conservativos”, por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. La variación menor análoga también puede incluir delección o inserción de aminoácidos, o ambos. Puede encontrarse orientación para determinar qué residuos de aminoácido pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin eliminar la actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR. También se describen ejemplos de sustituciones conservativas en el presente documento.
- 35 El término “gen” se usa de manera amplia para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o secuencias reguladoras requeridas para su expresión. El término “gen” se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificado por esa secuencia genómica.
- 40 Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen “promotores” y “potenciadores”, a los que se unen proteínas reguladoras tales como factores de transcripción, dando como resultado la transcripción de secuencias adyacentes o cercanas. Un promotor o potenciador “específico de tejido” es uno que regula la transcripción en un tipo de célula o tipo de tejido específico, o tipos.
- 45 “Expresión de un gen” o “expresión de un ácido nucleico” significa la transcripción de ADN en ARN (incluyendo opcionalmente la modificación del ARN, por ejemplo, corte y empalme alternativo), la traducción del ARN en un polipéptido (incluyendo posiblemente la modificación posterior del polipéptido, por ejemplo, modificación postraduccional), o tanto la transcripción como la traducción, según indique el contexto.
- 50
- 55

Un “marco de lectura abierto” u “ORF” es un posible marco de lectura traduccional de ADN o ARN (por ejemplo, de un gen), que puede traducirse en un polipéptido. Es decir, el marco de lectura no está interrumpido por codones de terminación. Sin embargo, debe indicarse que el término ORF no indica necesariamente que el polinucleótido se traduzca de hecho en un polipéptido.

5 El término “vector” se refiere a los medios mediante los cuales puede propagarse y/o transferirse un ácido nucleico entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones, cromosomas artificiales y similares, que se replican de manera autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula huésped. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto por tanto ADN como ARN dentro de la
10 misma hebra, un ADN o ARN conjugado con polilisina, un ADN o ARN conjugado con péptidos, un ADN conjugado con liposomas o similares, que no se replica de manera autónoma. En muchos, pero no todos los casos comunes, los vectores son plásmidos.

Un “vector de expresión” es un vector, tal como un plásmido que puede promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Normalmente, el ácido nucleico que va a expresarse está
15 “operativamente unido” a un promotor y/o potenciador, y se ve sometido a control regulatorio de la transcripción por el promotor y/o potenciador.

Un “vector de expresión bidireccional” se caracteriza por dos promotores alternativos orientados en la dirección opuesta en relación con un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de manera que puede iniciarse la expresión en ambas orientaciones dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de tanto ARN de hebra
20 positiva (+) o sentido, como de hebra negativa (-) o antisentido.

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

25 En el contexto de la invención, el término “aislado” se refiere a un material biológico, tal como un virus, un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan o interaccionan con el mismo en su entorno que se produce de manera natural. El material biológico aislado comprende opcionalmente material adicional no encontrado con el material biológico en su entorno natural, por ejemplo, un virus de tipo natural o una célula. Por ejemplo, si el material está en su entorno natural, tal como una
30 célula, el material puede colocarse en una ubicación en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativa para tal material encontrado en ese entorno. Por ejemplo, un ácido nucleico que se produce de manera natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un potenciador, etc.) se aísla si se introduce por medios que no se producen de manera natural en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, tal como un vector de virus o plásmido, o amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos se denominan también
35 ácidos nucleicos “heterólogos”. Un virus aislado, por ejemplo, está en un entorno (por ejemplo, un sistema de cultivo celular, o purificado del cultivo celular) distinto del entorno nativo del virus de tipo natural (por ejemplo, la nasofaringe de un individuo infectado).

El término “quimérico” o “quimera”, cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o de polipéptido derivados de más de una fuente o cepa viral original. De manera similar, el término “quimérico” o
40 “quimera”, cuando se refiere a una proteína viral, indica que la proteína incluye componentes de polipéptido (es decir, subsecuencias de aminoácidos) derivados de más de una fuente o cepa viral original.

El término “recombinante” indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) se ha alterado de manera artificial o sintética (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración puede realizarse en el material dentro de, o extraído de, su estado o entorno natural. Específicamente, por ejemplo, un virus influenza es
45 recombinante cuando se produce por la expresión de un ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, un “ácido nucleico recombinante” es uno que se prepara recombinando ácidos nucleicos, por ejemplos, durante la clonación, transposición del ADN u otros procedimientos, o por mutagénesis química u otra; un “polipéptido recombinante” o “proteína recombinante” es un polipéptido o proteína que se produce por la expresión de un ácido nucleico recombinante; y un “virus recombinante”, por ejemplo un virus influenza recombinante, se produce por la expresión
50 de un ácido nucleico recombinante.

El término “reagrupado”, cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o de polipéptido derivados de más de una fuente o cepa viral original. Por ejemplo, un reagrupamiento 7:1 incluye 7 segmentos genómicos virales (o segmentos génicos) derivados de un primer virus original, y un único segmento genómico viral complementario, por ejemplo, que codifica para una hemaglutinina o neuraminidasa. Un
55 reagrupamiento 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, lo más comúnmente los 6 genes internos de un primer virus original, y dos segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, de un virus original diferente.

El término “introducido” cuando se refiere a un ácido nucleico heterólogo o aislado, se refiere a la incorporación de

un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en la que el ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse de manera transitoria (por ejemplo ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación" y "transducción". En el contexto de la invención, puede emplearse una variedad de métodos para introducir ácidos nucleicos en células, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

El término "célula huésped" significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y soporta la replicación y/o expresión del ácido nucleico. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levaduras, insectos, anfibios, aves o mamíferos, incluyendo células humanas. Las células huésped a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, células Vero (riñón de mono verde africano), células BHK (riñón de cría de hámster), células de riñón de pollo primarias (PCK), células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T) y células COS (por ejemplo, células COS1, COS7), etc.

Una "cantidad inmunológicamente eficaz" de virus influenza es una cantidad suficiente para potenciar la propia respuesta inmunitaria de un individuo (por ejemplo, de un ser humano) frente a una exposición posterior a virus influenza. Pueden monitorizarse los niveles de inmunidad inducida, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos séricos y/o secretores neutralizantes, por ejemplo, mediante ensayo de neutralización de placas, de fijación del complemento, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o de microneutralización.

Una "respuesta inmunitaria protectora" frente a virus influenza se refiere a una respuesta inmunitaria presentada por un individuo (por ejemplo, un ser humano) que es protectora frente a la enfermedad cuando el individuo se expone posteriormente a y/o se infecta con tal virus influenza. En algunos casos, el virus influenza (por ejemplo, que circula de manera natural) puede provocar todavía infección, pero no puede provocar una infección grave. Normalmente, la respuesta inmunitaria protectora da como resultado niveles detectables de anticuerpos secretores y séricos engendrados por el huésped que pueden neutralizar el virus de la misma cepa y/o subgrupo (y posiblemente también de un subgrupo y/o cepa que no es de vacuna, diferente), *in vitro* e *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como miríadas de genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como o bien kappa o bien lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab)₂, un dímero de Fab que por sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 mediante un enlace disulfuro. El F(ab)₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra convirtiendo de ese modo el dímero (Fab)₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos Fab' pueden sintetizarse *de novo* o bien químicamente o bien utilizando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos o fragmentos o bien producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o bien sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla o múltiple, incluyendo anticuerpos Fv de cadena sencilla (sFv o scFv) en los que se unen entre sí una cadena pesada variable y una ligera variable (directamente o a través de un ligador peptídico) para formar un polipéptido continuo, y anticuerpos humanizados o quiméricos.

VIRUS INFLUENZA

Los polipéptidos y polinucleótidos descritos en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-20, son variantes de secuencias de HA y NA de influenza. En general, los virus influenza están constituidos por un núcleo de ribonucleoproteína interno que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envuelta lipoproteica externa revestida por una proteína de la matriz. El genoma de virus influenza está compuesto por ocho segmentos de ácido ribonucleico de hebra (-) lineal (ARN), que codifica para las proteínas inmunogénicas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y seis polipéptidos de núcleo interno: la nucleoproteína de la nucleocápsida (NP); proteínas de la matriz (M); proteínas no estructurales (NS); y 3 proteínas de ARN polimerasa (PA, PB1, PB2). Durante la replicación, el ARN viral genómico se transcribe en ARN mensajero de hebra (+) y ARNc genómico de hebra (-) en el

núcleo de la célula huésped. Cada uno de los ocho segmentos genómicos se empaqueta en complejos de ribonucleoproteína que contienen, además del ARN, NP y un complejo de polimerasa (PB1, PB2 y PA).

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

VACUNAS CONTRA VIRUS INFLUENZA

Las secuencias, composiciones y métodos en el presente documento se refieren principalmente, pero no únicamente, a la producción de virus influenza para vacunas. Históricamente, las vacunas contra el virus influenza se han producido principalmente en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionadas o basadas en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus reagrupados que incorporan antígenos de hemaglutinina y/o neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra sensible a la temperatura, atenuada, aprobada. Tras el cultivo del virus a través de múltiples pases en huevos de gallina, se recuperan virus influenza y, opcionalmente, se inactivan, por ejemplo, usando formaldehído y/o β -propiolactona (o alternativamente se usan en vacunas atenuadas vivas). Por tanto, se apreciará que las secuencias de HA y NA (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-20) son bastante útiles en la construcción de vacunas contra influenza. La presente descripción incluye virus/vacunas que comprenden secuencias de HA y/o NA de cepas de influenza pandémicas (incluyendo cuando las secuencias de HA comprenden sitios de escisión polibásicos modificados tales como las modificaciones descritas en el presente documento); e incluyendo cuando los virus/vacunas comprenden una estructura principal de ca tal como A/AA/6/60 o la estructura principal de PR8.

Los intentos de producir vacunas reagrupadas y recombinantes en cultivo celular se han visto dificultados por la incapacidad de algunas de las cepas aprobadas para la producción de vacunas para crecer eficazmente en condiciones de cultivo celular convencionales. Sin embargo, el trabajo previo por los inventores y sus colaboradores proporcionó un sistema de vector y métodos para producir virus reagrupados y recombinantes en cultivo, haciendo posible por tanto producir rápidamente vacunas correspondientes a una o muchas cepas antigénicas seleccionadas de virus, por ejemplo, cepas o bien A o bien B, diversos subtipos o subcepas, etc., por ejemplo, que comprenden las secuencias de HA y/o NA en el presente documento. Véase el sistema de múltiples plásmidos para la producción de virus influenza, documento US20044029251. Normalmente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como un incubador de cultivo celular, bajo CO_2 y humedad controlados, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para garantizar que la temperatura no supera 35°C. Pueden obtenerse fácilmente virus influenza reagrupados introduciendo un subconjunto de vectores que corresponden a segmentos genómicos de un virus influenza maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de HA y/o NA en el presente documento). Normalmente, las cepas maestras se seleccionan basándose en propiedades deseables relevantes para la administración de vacunas. Por ejemplo, para la producción de vacunas, por ejemplo, para la producción de una vacuna atenuada viva, la cepa de virus donadora maestra puede seleccionarse para un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura. Tal como se explica en otra parte en el presente documento, y, por ejemplo, en el documento US20044029251, la invención utiliza la cepa de influenza A/Ann Arbor (AA)/6/60 como "estructura principal" sobre la que añadir genes de HA y/o NA (por ejemplo, tal como las secuencias enumeradas en el presente documento, etc.) para crear virus reagrupados deseados tal como se menciona en las reivindicaciones. Por tanto, por ejemplo, en un reagrupamiento 6:2, 2 genes (es decir, NA y HA) serían de la(s) cepa(s) de influenza frente a la(s) que se desea una reacción inmunogénica, mientras que los otros 6 genes serían de la cepa Ann Arbor, u otra cepa de estructura principal, etc. El virus Ann Arbor es útil por sus atributos adaptados al frío, atenuados y sensibles a la temperatura. Por supuesto, se apreciará que las secuencias de HA y NA en el presente documento pueden reagruparse con varios otros genes de virus o tipos de virus (por ejemplo, varias "estructuras principales" diferentes tales como PR8, etc., que contienen los otros genes de influenza presentes en un reagrupamiento, concretamente, los genes que no

son HA ni NA).

Diversas realizaciones en el presente documento pueden comprender vacunas atenuadas vivas tal como se menciona en las reivindicaciones, que tienen las secuencias de HA y NA que comprenden respectivamente SEQ ID No: 15 y SEQ ID No. 16 en el presente documento, para gripe pandémica. Un problema que surge del crecimiento de cepas de virus de vacuna (por ejemplo, reagrupados) en huevos es que las cepas aviares (que pueden estar implicadas en pandemias) pueden destruir los huevos en los que van a producirse las vacunas y, por tanto, son difíciles de manipular, producir, etc. a través del uso de producción reagrupada tradicional (sin rescate con plásmidos). Tales cepas aviares son de interés puesto que las pruebas indican que pueden dar como resultado gripe en seres humanos y posibles pandemias. Por tanto, el uso de sistemas de rescate con plásmidos para crear/manipular reagrupados de influenza con cepas pandémicas tales como diversas secuencias aviares (por ejemplo, las secuencias de HA y NA en el presente documento) son bastante deseables. Se apreciará, sin embargo, que las secuencias actuales también pueden usarse con sistemas no plasmídicos o tradicionales.

Pueden infectarse aves acuáticas (entre otras) por virus influenza A de los subtipos hemaglutinina 15 (HA) y neuraminidasa 9 (NA). Tales aves pueden servir como reservorio a partir del que pueden introducirse subtipos de influenza novedosos en poblaciones humanas y provocar pandemias. La observación de que virus influenza A H7N7 aviares infectaron a seres humanos en los Países Bajos en 2003 y que virus H5N1 y H9N2 aviares infectaron a seres humanos en Hong Kong y China anteriormente, suscita la inquietud de que estos (y otros) subtipos tengan el potencial de provocar pandemias. Por tanto, se necesitan vacunas para prevenir infecciones humanas con virus influenza A aviares. Recientemente, se autorizaron en los Estados Unidos vacunas de virus influenza A atenuado, vivo contra virus influenza humanos. Véase anteriormente. Tales vacunas son virus H1N1 y H3N2 reagrupados en los que los genes de proteínas internos de virus adaptado al frío (*ca*) de A/Ann Arbor (AA)/6/60 (H2N2) confieren los fenotipos adaptado al frío, de atenuación y sensible a la temperatura de virus AA *ca* en los virus reagrupados (es decir, los que tienen los genes de hemaglutinina y neuraminidasa de la cepa distinta de Ann Arbor). Se han aplicado técnicas de genética inversa basada en plásmidos y reagrupamiento genético clásico para generar virus reagrupados que contienen los genes de hemaglutinina y neuraminidasa de virus influenza A aviares (subtipos H4-H14) y seis segmentos génicos internos del virus AA *ca*. Tales virus reagrupados tal como se menciona en las reivindicaciones son características de la invención. Véanse las secuencias de genes de HA y NA a continuación. Estos virus portan propiedades biológicas que son deseables en vacunas candidatas porque los fenotipos asociados con los virus AA *ca* están presentes en los virus reagrupados. La generación y evaluación de estos virus reagrupados como virus simiente para vacunas son etapas importantes en la preparación pandémica. Se contempla que ensayos clínicos puedan establecer la seguridad, infectividad e inmunogenicidad de tales vacunas pandémicas atenuadas vivas. También se incluyen métodos de construcción y uso de tales virus y vacunas. "Cepas de virus pandémicas" tal como se usa en el presente documento se define como un subtipo de virus influenza cepa A que no está circulando en la población humana, que se declara que es una cepa pandémica por los Centros para el Control de Enfermedades o la Organización Mundial de la Salud o se reconocen generalmente como tales dentro de la comunidad científica.

Tal como se describe en el presente documento, las secuencias antigénicas (por ejemplo, las secuencias de HA) así como virus y vacunas de tales virus comprenden sitios de escisión polibásicos modificados. Algunas cepas de influenza pandémicas aviares altamente patogénicas comprenden múltiples sitios de escisión de aminoácidos básicos dentro de secuencias de hemaglutinina. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, J. of Infectious Diseases, 179:1132-8, 1999. Tales sitios de escisión, en realizaciones típicas en el presente documento, por ejemplo, están modificados o alterados en sus secuencias en comparación con las secuencias de tipo natural de las que se derivan las secuencias actuales (por ejemplo, para inutilizar la escisión o reducir la escisión en las mismas, etc.). Tales modificaciones/alteraciones pueden ser diferentes en diferentes cepas debido a las diversas secuencias de los sitios de escisión en las secuencias de tipo natural. Por ejemplo, se eliminan normalmente en secuencias en el presente documento 4 residuos polibásicos (RRKK) en 326-329 de H5 madura (en comparación con wt). Véase la lista de secuencias y la figura 1. Los sitios de escisión polibásicos pueden modificarse de varios modos. Por ejemplo, el sitio de escisión polibásico puede eliminar un aminoácido de una vez (por ejemplo un R eliminado, dos R eliminados, RRK eliminados o RRKK eliminados). Adicionalmente, el residuo de aminoácido directamente en el sentido de 5' del sitio de escisión también puede eliminarse o alterarse (por ejemplo, de un R a un T, etc.); además, también pueden modificarse los nucleótidos que codifican para el residuo de aminoácido directamente tras el sitio de escisión. Véase, por ejemplo, la figura 1 para una ilustración de la modificación del sitio de escisión. Además, secuencias de polipéptido de hemaglutinina de virus influenza comprenden secuencias de péptido señal amino terminal, por tanto, las secuencias de polipéptido de hemaglutinina incluyen tanto la forma madura (péptido señal amino terminal escindido) de los polipéptidos de hemaglutinina como la forma pre-escindida de hemaglutinina. Los sitios de escisión de cualquier secuencia de polipéptido de hemaglutinina de cualquier cepa de influenza pueden medirse o predecirse rutinariamente usando cualquiera de varios métodos en la técnica.

Los términos "sensible a la temperatura", "adaptado al frío" y "atenuado" tal como se aplican a virus (normalmente usados como vacunas o para la producción de vacunas) que abarcan opcionalmente las presentes secuencias, se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el término "sensible a la temperatura" (*ts*) indica, por ejemplo, que el virus presenta una reducción de 100 veces o más en el título a 39°C en relación con 33°C para cepas de influenza A, o que el virus presenta una reducción de 100 veces o más en el título a 37°C en relación con 33°C para cepas de influenza B. El término "adaptado al frío" (*ca*) indica que el virus presenta crecimiento a 25°C dentro de 100 veces de

su crecimiento a 33°C, mientras que el término “atenuado” (*att*) indica que el virus se replica en las vías respiratorias superiores de hurones pero no es detectable en sus tejidos pulmonares, y no provoca enfermedad de tipo gripe en el animal. Se entenderá que virus con fenotipos intermedios, es decir, virus que presentan reducciones en el título inferiores a 100 veces a 39°C (para virus de la cepa A) o 37°C (para virus de la cepa B), o que presentan crecimiento a 25°C que es mayor de 100 veces su crecimiento a 33°C (por ejemplo, dentro de 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 10.000 veces menos), y/o presentan crecimiento reducido en los pulmones en relación con el crecimiento en las vías respiratorias superiores de hurones (es decir, parcialmente atenuados) y/o enfermedad de tipo gripe en el animal, también son virus útiles y pueden usarse conjuntamente con las secuencias de HA y NA en el presente documento.

De nuevo, las secuencias de HA y NA descritas en el presente documento se utilizan en tales vacunas reagrupadas con plásmidos (y/o en otros virus y vacunas *ts*, *cs*, *ca* y/o *att*).

FLUMIST™

Tal como se mencionó anteriormente, existen numerosos ejemplos y tipos de vacunas contra influenza. Una vacuna contra influenza a modo de ejemplo es FluMist™ que es una vacuna viva, atenuada que protege a niños y adultos de la enfermedad de la gripe (Belshe *et al.* (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Nichol *et al.* (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44).

Las cepas de la vacuna FluMist™ contienen, por ejemplo, segmentos de genes de HA y NA derivados de las cepas (por ejemplo, cepas de tipo natural) a las que se dirige la vacuna junto con seis segmentos de genes, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, de un virus donador maestro común (MDV). El MDV para las cepas de influenza A de FluMist™ (MDV-A) se creó mediante pase en serie de la cepa A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) de tipo natural en cultivo tisular de riñón de pollo primario a temperaturas sucesivamente inferiores (Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213:612-4). MDV-A se replica eficazmente a 25°C (*ca*, adaptado al frío), pero su crecimiento se restringe a 38 y 39°C (*ts*, sensible a la temperatura). Adicionalmente, este virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (*att*, atenuación). Se cree que el fenotipo *ts* contribuye a la atenuación de la vacuna en seres humanos restringiendo su replicación en todas excepto las regiones más frías del aparato respiratorio. La estabilidad de esta propiedad se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos. En contraposición al fenotipo *ts* de cepas de influenza creadas mediante mutagénesis química, la propiedad *ts* de MDV-A no se revierte tras el pase a través de hámsteres infectados o en aislados extraídos de niños (para una revisión reciente, véase Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A y B virus vaccines Viral Immunol 15:295-323).

Estudios clínicos en más de 20.000 adultos y niños que implicaban 12 cepas con reagrupamiento 6:2 separadas han mostrado que estas vacunas están atenuadas, son seguras y eficaces (Belshe *et al.* (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Boyce *et al.* (2000) Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19:217-26; Edwards *et al.* (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J Infect Dis 169:68-76; Nichol *et al.* (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). Los reagrupados que portan los seis genes internos de MDV-A y los dos segmentos de genes de HA y NA de un virus de tipo natural (es decir, un reagrupamiento 6:2) mantienen de manera constante los fenotipos *ca*, *ts* y *att* (Maassab *et al.* (1982) Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets J. Infect. Dis. 146:780-900).

La producción de tales virus reagrupados usando cepas B de influenza es más difícil, sin embargo, el trabajo reciente (véase, por ejemplo, Sistema de múltiples plásmidos para la producción de virus Influenza, documento US 20044029251) ha mostrado un sistema de ocho plásmidos para la generación de virus influenza B completamente a partir de ADNc clonado. También se mostraron métodos para la producción de virus influenza A y B vivos atenuados adecuados para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacuna de virus vivos útiles para administración intranasal.

El sistema y los métodos descritos anteriormente son útiles para la producción rápida en cultivo celular de virus influenza A y B recombinantes y reagrupados, incluyendo virus adecuados para su uso como vacunas, incluyendo vacunas atenuadas vivas, tales como vacunas adecuadas para administración intranasal. Las secuencias (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-10 y los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 11-20), los métodos, etc. descritos en el presente documento opcionalmente se usan conjuntamente con, o en combinación con, tal trabajo previo que implica, por ejemplo, virus influenza reagrupados para la producción de vacunas para producir virus para vacunas.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA ADMINISTRACIÓN PROFILÁCTICA DE VACUNAS

Los virus recombinantes y reagrupados descritos en el presente documento (por ejemplo, los que comprenden los polinucleótidos de SEQ ID NO: 1-10 o los polipéptidos de SEQ ID NO: 11-20, o fragmentos de los mismos), en particular los citados en las reivindicaciones, pueden administrarse profilácticamente en una cantidad

- 5 inmunológicamente eficaz y en un vehículo o excipiente apropiado para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepa(s) de virus influenza tal como se determina mediante la secuencia de HA y/o NA. Normalmente, el vehículo o excipiente es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución salina acuosa, soluciones salinas tamponadas acuosas, disoluciones de dextrosa acuosas, disoluciones de glicerol acuosas, etanol o combinaciones de los mismos. La preparación de tales disoluciones que garantizan la esterilidad, el pH, la isotonicidad y la estabilidad se efectúa según protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un vehículo o excipiente para minimizar efectos alérgicos y otros efectos no deseados, y para adecuarse a la vía de administración particular, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.
- 10 Un aspecto relacionado de la invención proporciona el virus influenza reagrupado tal como se menciona en las reivindicaciones para su uso en métodos para estimular el sistema inmunitario de un individuo para producir una respuesta inmunitaria protectora frente al virus influenza. En los métodos, se administra una cantidad inmunológicamente eficaz de un virus influenza recombinante (por ejemplo, que comprende una molécula de HA y/o NA tal como se describe en el presente documento) al individuo en un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 15 Generalmente, los virus influenza de la invención se administran en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepa(s) de virus influenza (es decir, contra las cepas de HA y/o NA descritas en el presente documento). Preferiblemente, la administración de los virus influenza provoca una respuesta inmunitaria protectora frente a tales cepas. Los expertos en la técnica conocen dosificaciones y métodos para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra una o más cepa(s) de influenza. Véanse, por ejemplo, el documento USPN 5.922.326; Wright *et al.*, *Infect. Immun.* 37:397-400 (1982); Kim *et al.*, *Pediatrics* 52:56-63 (1973); y Wright *et al.*, *J. Pediatr.* 88:931-936 (1976). Por ejemplo, se proporcionan virus influenza en el intervalo de aproximadamente 1-1000 HID_{50} (dosis infecciosa humana), es decir, aproximadamente 10^5 - 10^8 ufp (unidades formadoras de placa) por dosis administrada. Normalmente, la dosis se ajustará dentro de este intervalo basándose, por ejemplo, en la edad, el estado físico, el peso corporal, el sexo, la dieta, el momento de administración y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y jeringuilla, o un dispositivo de inyección sin aguja. Alternativamente, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, mediante o bien gotas, aerosol de partículas grandes (mayores de aproximadamente 10 micrómetros) o bien pulverización en el aparato respiratorio superior. Aunque cualquiera de las vías anteriores de administración da como resultado una respuesta inmunitaria sistémica protectora, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad mucosa en el sitio de entrada del virus influenza. Para la administración intranasal, se prefieren a menudo vacunas de virus vivos atenuados, por ejemplo, un virus influenza recombinante o reagrupado atenuado, adaptado al frío y/o sensible a la temperatura. Véase anteriormente. Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmunitaria protectora con una única dosis, pueden administrarse dosificaciones adicionales, mediante la misma vía o diferente, para lograr el efecto profiláctico deseado.
- 20
- 25
- 30
- 35 Normalmente, el virus influenza recombinante atenuado de esta invención tal como se usa en una vacuna está suficientemente atenuado de manera que no se producirán síntomas de infección, o al menos síntomas de infección grave, en la mayoría de los individuos inmunizados (o infectados de otra forma) con el virus influenza atenuado. En algunos casos, el virus influenza atenuado todavía puede producir síntomas de enfermedad leve (por ejemplo, enfermedad respiratoria superior leve) y/o diseminación a individuos no vacunados. Sin embargo, su virulencia está lo suficientemente suprimida de manera que no se producen infecciones del aparato respiratorio inferior graves en el huésped vacunado o accidental.
- 40
- 45 Alternativamente, puede estimularse una respuesta inmunitaria seleccionando como diana *ex vivo* o *in vivo* células dendríticas con virus influenza que comprenden las secuencias en el presente documento. Por ejemplo, se exponen células dendríticas en proliferación a virus en una cantidad suficiente y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la captura de los antígenos de influenza por las células dendríticas. Las células se transfieren entonces a un sujeto que va a vacunarse mediante métodos de trasplante intravenoso convencional.
- 50 Mientras que se prefiere la estimulación de una respuesta inmunitaria protectora con una única dosis, pueden administrarse dosificaciones adicionales, mediante la misma o diferente vía, para lograr el efecto profiláctico deseado. En neonatos y lactantes, por ejemplo, pueden requerirse múltiples administraciones para provocar niveles suficientes de inmunidad. La administración puede continuar a intervalos durante toda la infancia, según sea necesario para mantener niveles suficientes de protección frente a la infección por influenza de tipo natural. De manera similar, adultos que son particularmente susceptibles a infección por influenza repetida o grave, tales como, por ejemplo, trabajadores de atención sanitaria, trabajadores de guarderías, miembros de la familia de niños jóvenes, los ancianos e individuos con función cardiopulmonar comprometida pueden requerir múltiples inmunizaciones para establecer y/o mantener respuestas inmunitarias protectoras. Los niveles de inmunidad inducida pueden monitorizarse, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos séricos y secretores neutralizantes, y ajustarse las dosificaciones o repetirse las vacunaciones según sea necesario para provocar y mantener niveles deseados de protección.
- 55
- 60 Opcionalmente, la formulación para administración profiláctica de los virus influenza también contiene uno o más adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria frente a los antígenos de influenza. Los adyuvantes adecuados

incluyen: adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite o hidrocarburos, bacilo Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum* y el adyuvante sintético QS-21.

5 Si se desea, puede realizarse la administración de vacuna profiláctica de virus influenza conjuntamente con la administración de una o más moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante (CSF) de colonias de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas
10 inmunoestimuladoras, tales como tal como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que los virus influenza, o pueden administrarse por separado.

Aunque la vacunación de un individuo con un virus de influenza atenuado de una cepa particular de un subgrupo particular puede inducir protección cruzada contra virus influenza de diferentes cepas y/o subgrupos, la protección
15 cruzada puede potenciarse, si se desea, vacunando al individuo con virus influenza atenuados de al menos dos cepas, por ejemplo, cada una de las cuales representa un subgrupo diferente. Adicionalmente, las combinaciones de vacunas pueden incluir opcionalmente mezclas de vacunas pandémicas (por ejemplo, aquéllas contra cepas de influenza pandémicas tales como diversas cepas aviarias, véanse, por ejemplo, las secuencias en el presente documento, u otras cepas pandémicas) y cepas no pandémicas. Las mezclas de vacunas (o vacunaciones múltiples)
20 pueden comprender componentes de cepas humanas y/o cepas de influenza no humanas (por ejemplo, aviarias y humanas, etc.). De manera similar, las vacunas de virus influenza atenuados de esta invención pueden combinarse opcionalmente con vacunas que inducen respuestas inmunitarias protectoras contra otros agentes infecciosos.

POLINUCLEÓTIDOS

Se sabe bien en la técnica que los segmentos de polinucleótido de HA y NA de virus influenza comprenden tanto una región codificante (que codifica para el ORF) como regiones no codificantes (NCR), tanto en 5' como en 3' de la
25 secuencia que codifica para HA y NA. Se muestran ejemplos de estas NCR en SEQ ID NOS: 1-9 (fuera de los ORF). También se sabe que pueden prepararse cebadores para estas NCR para facilitar la amplificación de los segmentos de HA y NA completos de virus influenza. (Véase, por ejemplo, Hoffmann *et al.* Arch Virol. Diciembre de 2001; 146(12): 2275-89). Además, se sabe que las NCR de la HA y NA de influenza pueden aumentar la eficacia de lograr reagrupamientos. Por tanto, las secuencias de polinucleótido de estas NCR se describen en el presente documento. Cuando se amplifican los segmentos de HA y NA de cualquiera cepa pandémica, podrían prepararse y usarse
30 cebadores de polinucleótido para unirse a regiones conservadas (por ejemplo, entre cepas relacionadas) de las NCR de HA y NA para la amplificación (por ejemplo, mediante RT-PCR).

Los polinucleótidos de HA y NA del virus de la invención, SEQ ID NO: 5 o por ejemplo SEQ ID NO: 6, se usan
35 opcionalmente en varias capacidades diferentes alternativamente a, o además de, las vacunas descritas anteriormente. Se describen en el presente documento otros usos a modo de ejemplo en el presente documento para fines ilustrativos y no como limitaciones en la gama actual de usos. También se describen en el presente documento diferentes métodos de construcción, purificación y caracterización de las secuencias de nucleótidos de la descripción. Se describe en el presente documento que ácidos nucleicos incluyendo una o más secuencia(s) de polinucleótido(s) descritas anteriormente se usan favorablemente como sondas para la detección de ácidos nucleicos correspondientes o relacionados en una variedad de contextos, tal como en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para encontrar y/o caracterizar variantes de influenza homólogas (por ejemplo, homólogos para las secuencias en el presente documento, etc.) que infectan a otras especies o en brotes de gripe diferentes, etc. Las sondas pueden ser moléculas de o bien ADN o bien ARN, tales como fragmentos de restricción de ADN genómico o clonado, ADNc, productos de amplificación por PCR, transcritos y oligonucleótidos, y pueden
40 variar en longitud desde oligonucleótidos tan cortos como aproximadamente 10 nucleótidos de longitud hasta secuencias de longitud completa o ADNc en exceso de 1 kb o más. Por ejemplo, una sonda incluye una secuencia o subsecuencia de polinucleótido seleccionada, por ejemplo, de entre SEQ ID NO: 5 o por ejemplo SEQ ID NO: 6, o secuencias complementarias a las mismas. Alternativamente, se usan como sondas secuencias de polinucleótido que son variantes de una de las secuencias designadas anteriormente. Lo más normalmente, tales variantes incluyen una o unas cuantas variaciones de nucleótidos conservativas. Por ejemplo, pueden seleccionarse pares (o conjuntos) de oligonucleótidos, en los que las dos (o más) secuencias de polinucleótido son variaciones conservativas entre sí, en las que una secuencia de polinucleótido corresponde idénticamente a una primera variante o/y la(s) otra(s) corresponden idénticamente a variantes adicionales. Tales pares de sondas oligonucleotídicas son particularmente útiles, por ejemplo, para experimentos de hibridación específicos para detectar nucleótidos polimórficos o, por ejemplo, para detectar variantes de HA y NA de influenza homólogas, por ejemplo, homólogas a las secuencias de HA y NA actuales, que infectan a otras especies o están presentes en brotes de gripe diferentes (por ejemplo, o bien temporalmente y/o bien geográficamente diferentes). En otras aplicaciones, se seleccionan sondas que son más divergentes, es decir, se seleccionan sondas que son al menos
50 aproximadamente el 91% (o aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 98,5%, aproximadamente el 98,7%, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 99,1%,

aproximadamente el 99,2%, aproximadamente el 99,3%, aproximadamente el 99,4%, aproximadamente el 99,5%, o aproximadamente el 99,6% o más aproximadamente el 99,7%, aproximadamente el 99,8%, aproximadamente el 99,9% o más) idénticas.

5 Las sondas descritas en el presente documento por ejemplo, tal como se muestra modo de ejemplo mediante
 10 secuencias derivadas de las secuencias en el presente documento, también pueden usarse para identificar
 secuencias de polinucleótido útiles adicionales según procedimientos rutinarios en la técnica. Se utilizan una o más
 sondas, tal como se describió anteriormente, para examinar bibliotecas de productos de expresión o segmentos
 cromosómicos (por ejemplo, bibliotecas de expresión o bibliotecas genómicas) para identificar clones que incluyen
 15 secuencias idénticas a, o con similitud de secuencia significativa con, por ejemplo, una o más sonda(s) de las
 secuencias en el presente documento, es decir, variantes, homólogos, etc. Se entenderá que además de métodos
 físicos tales como examen de bibliotecas, también pueden usarse enfoques bioinformáticos asistidos por ordenador,
 por ejemplo, BLAST y otros algoritmos de búsqueda de homología de secuencia, y similares, para identificar
 secuencias de polinucleótido relacionadas.

15 Se producen opcionalmente sondas oligonucleotídicas mediante una variedad de métodos bien conocidos por los
 expertos en la técnica. Lo más normalmente, se producen mediante métodos sintéticos bien conocidos, tales como
 el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981) *Tetrahedron Letts*
 22(20): 1859-1862, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, o tal como se describe en Needham-Van
 20 Devanter *et al.* (1984) *Nucl Acids Res*, 12: 6159-6168. También pueden prepararse oligonucleótidos a medida y
 pedirse de una variedad de fuentes comerciales conocidas por los expertos. La purificación de oligonucleótidos,
 cuando sea necesario, se realiza normalmente mediante o bien electroforesis en gel de acrilamida nativa o bien
 mediante HPLS de intercambio aniónico tal como se describe en Pearson y Regnier (1983) *J Chrom* 255: 137-149.
 La secuencia de los oligonucleótidos sintéticos puede verificarse usando el método de degradación química de
 Maxam y Gilbert (1980) en Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, Nueva York, *Methods in Enzymology* 65:
 25 499-560. También pueden pedirse fácilmente oligonucleótidos a medida de una variedad de fuentes comerciales
 conocidas por los expertos.

En otras circunstancias, por ejemplo, que se refieren a atributos de células u organismos que expresan los
 polinucleótidos y polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, los que albergan virus que
 comprenden las secuencias descritas en el presente documento), se utilizan favorablemente sondas que son
 30 polipéptidos, péptidos o anticuerpos. Por ejemplo, se usan favorablemente polipéptidos aislados o recombinantes,
 fragmentos de polipéptido y péptidos derivados de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el
 presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 15-16) y/o codificados por secuencias de polinucleótido descritas en
 el presente documento, por ejemplo, seleccionadas de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10, para identificar y aislar
 anticuerpos, por ejemplo, a partir de bibliotecas de presentación en fago, bibliotecas combinatorias, sueros
 policlonales y similares. Los fragmentos de polipéptido incluyen un péptido o polipéptido que comprende una
 35 secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 10 residuos de aminoácido
 contiguos, o al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, o al
 menos 25 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 50
 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 70 residuos de
 40 aminoácido contiguos, o al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 90 residuos de aminoácido
 contiguos, o al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 125 residuos de aminoácido contiguos,
 o al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 200
 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 350 residuos de
 aminoácido contiguos, o al menos 400 contiguos, o al menos 450 contiguos, o al menos 500 contiguos, o al menos
 45 550 contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HA o NA descrito en el presente documento (por
 ejemplo, SEQ ID Nos: 11-20). También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican para
 dichos fragmentos de polipéptido y anticuerpos que se unen específicamente a dichos polipéptidos.

Anticuerpos específicos para cualquier secuencia o subsecuencia de polipéptido, por ejemplo, de SEQ ID NO: 11 a
 SEQ ID NO: 20, y/o codificados por secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento, por ejemplo,
 50 seleccionadas de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10, son así mismo valiosos como sondas para evaluar productos de
 expresión, por ejemplo, a partir de células o tejidos. Además, los anticuerpos son particularmente adecuados para
 evaluar la expresión de proteínas que comprenden subsecuencias de aminoácidos, por ejemplo, de las que se
 facilitan en el presente documento, o codificadas por secuencias de polinucleótido descritas en el presente
 documento, por ejemplo, seleccionadas de las mostradas en el presente documento, *in situ*, en un alineamiento de
 55 tejido, en una célula, tejido u organismo, por ejemplo, un organismo infectado por un virus influenza no identificado o
 similar. Los anticuerpos pueden marcarse directamente con un reactivo detectable, o detectarse indirectamente
 marcando un anticuerpo secundario específico para la región constante de cadena pesada (es decir, isotipo) del
 anticuerpo específico). Se proporcionan a continuación detalles adicionales referentes a la producción de
 anticuerpos específicos.

Ensayos de diagnóstico

60 Las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden usarse en ensayos de diagnóstico
 para detectar influenza (y/o hemaglutinina y/o neuraminidasa) en una muestra, para detectar secuencias similares a

hemaglutinina y/o similares a neuraminidasa, y para detectar diferencias de cepas en aislados clínicos de influenza usando fragmentos de polinucleótido o bien químicamente sintetizados o bien recombinantes, por ejemplo, seleccionados de las secuencias en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de las secuencias de hemaglutinina y/o neuraminidasa que comprenden al menos entre 10 y 20 nucleótidos como cebadores para amplificar ácidos nucleicos usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidos en la técnica (por ejemplo, PCR con transcripción inversa) y como sondas en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos para detectar material genético diana tal como ARN de influenza en muestras clínicas.

Las sondas descritas en el presente documento, por ejemplo, tal como se muestra a modo de ejemplo mediante subsecuencias únicas seleccionadas de las facilitadas en el presente documento, también pueden usarse para identificar secuencias de polinucleótido útiles adicionales (tal como para caracterizar cepas de influenza adicionales) según procedimientos de rutina en la técnica. Una o más sondas, tal como se describió anteriormente, se utilizan para examinar bibliotecas de productos de expresión o ácidos nucleicos virales clonados (es decir, bibliotecas de expresión o bibliotecas genómicas) para identificar clones que incluyen secuencias idénticas a, o con identidad de secuencia significativa con las secuencias en el presente documento. A su vez, cada una de estas secuencias identificadas puede usarse para preparar sondas, incluyendo pares o conjuntos de sondas variantes tal como se describió anteriormente. Se entenderá que además de tales métodos físicos tales como examen de bibliotecas, también pueden usarse enfoques bioinformáticos asistidos por ordenador, por ejemplo, BLAST y otros algoritmos de búsqueda de homología de secuencia, y similares, para identificar secuencias de polinucleótido relacionadas.

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

Se apreciará que el diseño de la sonda se ve influido por la aplicación prevista. Por ejemplo, cuando van a detectarse varias interacciones sonda-diana específicas de alelo en un único ensayo, por ejemplo, en un único chip de ADN, es deseable tener temperaturas de fusión similares para todas las sondas. Por consiguiente, las longitudes de las sondas se ajustan de modo que las temperaturas de fusión para todas las sondas en el alineamiento sean estrechamente similares (se apreciará que pueden necesitarse diferentes longitudes para diferentes sondas para lograr una T_m particular cuando diferentes sondas tienen diferentes contenidos en GC). Aunque la temperatura de fusión es una consideración primaria en el diseño de la sonda, se usan opcionalmente otros factores para ajustar adicionalmente la construcción de sondas, tales como seleccionar frente a la autocomplementariedad de cebadores y similares.

Vectores, promotores y sistemas de expresión

También se describen en el presente documento constructos recombinantes que incorporan una o más de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento. Tales constructos incluyen opcionalmente un vector, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), etc., en el que una o más de las secuencias de polinucleótido de SEQ ID NO: 5 o por ejemplo, SEQ ID NO: 6, o una subsecuencia de las mismas, etc., se ha insertado, en una orientación directa o inversa. Por ejemplo, el ácido nucleico insertado puede incluir una secuencia cromosómica viral o ADNc que incluye toda o parte de al menos una de las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento. En un aspecto, el constructo comprende además secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, operativamente unido a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes números de promotores y vectores adecuados, y están disponibles comercialmente.

Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden incluirse en uno cualquiera de una variedad de vectores adecuados para generar ARN sentido o antisentido, y opcionalmente, productos de expresión de polipéptido (o péptido) (por ejemplo, una molécula de hemaglutinina y/o neuraminidasa tal como se describe en el presente documento). Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar, pseudorrabia, adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y muchos otros (por ejemplo, pCDL). Puede usarse cualquier vector que pueda introducir material genético en una célula y, si se desea replicación, que pueda replicarse en el huésped relevante.

En un vector de expresión, la secuencia de polinucleótido de HA y/o NA de interés está físicamente dispuesta en proximidad y orientación con una secuencia de control de la transcripción apropiada (por ejemplo, promotor, y opcionalmente uno o más potenciadores) para dirigir la síntesis de ARNm. Es decir, la secuencia de polinucleótido de interés está operativamente unida a una secuencia de control de la transcripción apropiada. Los ejemplos de tales promotores incluyen: promotor de SV40 o LTR, promotor lac o trp de *E. coli*, promotor P_L de fago lambda y

otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procariontas o eucariotas y sus virus.

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

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

Los vectores descritos en el presente documento también incluyen favorablemente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm, tal como un sitio de poliadenilación o una secuencia terminadora. Tales secuencias están disponibles comúnmente de las regiones no traducidas en 5' y, ocasionalmente en 3', de ADN o ADNc virales o eucariotas. Las secuencias de señal de poliadenilación de SV40 pueden proporcionar un sitio de poliadenilación bidireccional que protege la transcripción de las moléculas de ARNm de hebra (+) de la replicación iniciada por el promotor de Poll del genoma viral de hebra (-).

Además, tal como se describió anteriormente, los vectores de expresión incluyen opcionalmente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, además de los genes enumerados anteriormente, marcadores tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina son adecuados para la selección en cultivo de células eucariotas.

El vector que contiene las secuencias de ácido nucleico apropiadas tal como se describió anteriormente, así como una secuencia de control o promotor apropiado, puede emplearse para transformar una célula huésped permitiendo la expresión de la proteína. Aunque los vectores descritos en el presente documento pueden replicarse en células bacterianas, lo más frecuentemente será deseable introducirlos en células de mamífero, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293, células COS o similares, para el fin de expression.

Tal como se describe en otra parte, las secuencias de HA y NA en el presente documento pueden estar comprendidas dentro de plásmidos implicados en reagrupamiento por rescate con plásmidos. Véanse, por ejemplo, los documentos US2004029251 y US2005042229. Por ejemplo, los vectores de expresión preferidos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, vectores que comprenden el promotor de pol I y secuencias terminadoras o vectores que usan los promotores tanto de pol I como de pol II, "el sistema de promotores de poll/poll" (por ejemplo, Zobel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 1993, 21: 3607; documento US20020164770; Neumann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96:9345; Fodor *et al.*, *J. Virol.* 1999, 73:9679; y documento US20030035814). Los reagrupados producidos incluyen los genes de HA y NA dispuestos con los otros 6 genes de influenza de la cepa donadora A/Ann Arbor/6/60 (y/o derivados y modificaciones de los mismos), la estructura principal de cepa donadora PR8, la estructura principal de cepa donadora A/Leningrad/17, etc. Se describen otras cepas de estructura principal, por ejemplo, en los documentos US20040137013 y US0030147916.

Elementos de expresión adicionales

Lo más comúnmente, el segmento de genoma que codifica para la proteína HA y/o NA de virus influenza incluye cualquier secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo traducción en una proteína viral funcional. En otras situaciones, puede emplearse un minigen, u otro constructo artificial que codifica para las proteínas virales, por ejemplo, una proteína de HA y/o NA. De nuevo, en tal caso, a menudo es deseable incluir señales de iniciación específicas que ayudan en la traducción eficaz de la secuencia codificante heteróloga. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Para garantizar la traducción de todo el inserto, el codón de iniciación se inserta en el marco de lectura correcto en relación con la proteína viral. Los elementos transcripcionales exógenos y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema

celular en uso.

Si se desea, pueden incorporarse en el vector secuencias de polinucleótido que codifican para elementos expresados adicionales, tales como secuencias señal, secuencias de secreción o localización, y similares, habitualmente en marco con la secuencia de polinucleótido de interés, por ejemplo, para seleccionar como diana la expresión del polipéptido en un orgánulo, membrana o compartimento celular deseado, o para dirigir la secreción del polipéptido al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Tales secuencias las conocen los expertos, e incluyen péptidos líder de secreción, secuencias de direccionamiento a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en el RE, secuencias de tránsito mitocondrial), secuencias de anclaje/localización en la membrana (por ejemplo, secuencias de transferencia de terminación, secuencias de anclaje GPI) y similares.

Cuando se desea la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento, señales de iniciación específicas de traducción adicionales pueden mejorar la eficacia de traducción. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, un codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, una región de IRES, etc. En algunos casos, por ejemplo, se insertan moléculas de ADNc de longitud completa o segmentos cromosómicos que incluyen una secuencia codificante que incorpora, por ejemplo, una secuencia de polinucleótido tal como se describe en el presente documento, un codón de iniciación de la traducción y elementos de secuencia asociados, en el vector de expresión apropiado simultáneamente con la secuencia de polinucleótido de interés. En tales casos, no se requieren frecuentemente señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que sólo se inserta una secuencia que codifica para el polipéptido, o una parte de la misma, a menudo se proporcionan señales de control de la traducción exógenas, incluyendo, por ejemplo, un codón de iniciación ATG, para la expresión de la secuencia relevante. El codón de iniciación se pone en el marco de lectura correcto para garantizar la transcripción de la secuencia de polinucleótido de interés. Los elementos transcripcionales exógenos y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véanse, por ejemplo, ScharfD. *et al.* (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner *et al.* (1987) *Methods in Enzymol* 153:516-544).

Producción de virus recombinante

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

Cultivo celular y huéspedes de expresión

También se describen en el presente documento células huésped que se introducen (transducen, transforman o transfectan) con vectores descritos en el presente documento, y la producción de polipéptidos descritos en el presente documento mediante técnicas recombinantes. Las células huésped se modifican por ingeniería genética (es decir, transducen, transforman o transfectan) con un vector, tal como un vector de expresión. Tal como se describió anteriormente, el vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Los ejemplos de huéspedes de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Neurospora crassa*; o células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*.

Lo más comúnmente, se usan células de mamífero para cultivar las moléculas de HA y NA descritas en el presente documento. Las células huésped adecuadas para la replicación de virus influenza incluyen, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7 o similares. Comúnmente, se emplean cocultivos que incluyen dos de las líneas celulares anteriores, por ejemplo, células MDCK y o bien células 293T o bien COS a una razón, por ejemplo, de 1:1, para mejorar la eficacia de replicación. Normalmente, se cultivan las células en un medio de cultivo comercial convencional, tal como medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero (por ejemplo, suero bovino fetal al 10%), o en medio libre de suero, bajo humedad controlada y concentración de CO₂ adecuada para mantener el pH tamponado neutro (por ejemplo, a pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para prevenir el crecimiento

bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomycin, etc., y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, complementos adicionales para promover características de crecimiento favorables, por ejemplo, tripsina, β -mercaptoetanol y similares.

5 Las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar las secuencias de polinucleótido insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son normalmente las usadas anteriormente con la célula huésped particular seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para los expertos en la técnica y en la bibliografía mencionada en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3ª edición, Wiley-Liss, Nueva York y la bibliografía mencionada en la misma. Otra bibliografía útil incluye, por ejemplo, Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edinburg; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work y Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam. Los detalles adicionales referentes a procedimientos de cultivo tisular de particular interés en la producción de virus influenza *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten *et al.* (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. En Cohen y Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Adicionalmente, se determinan fácilmente variaciones en tales procedimientos adaptados a la presente descripción a través de experimentación rutinaria y serán familiares para los expertos en la técnica.

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

35 Independientemente del volumen de cultivo, en muchos aspectos deseados de la presente descripción, es importante que los cultivos se mantengan a una temperatura apropiada, para garantizar una recuperación eficaz de virus influenza recombinante y/o reagrupado usando sistemas de múltiples plásmidos dependientes de temperatura (véase, por ejemplo, Sistema de múltiples plásmidos para la producción de virus influenza, documento US2004029251), calentamiento de disoluciones de virus para la filtración, etc. Normalmente, se emplea un regulador, por ejemplo, un termostato, u otro dispositivo para detectar y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular y/u otra disolución, para garantizar que la temperatura está al nivel correcto durante el periodo apropiado (por ejemplo, replicación del virus, etc.).

45 En la descripción en el presente documento (por ejemplo, cuando van a producirse virus reagrupados a partir de segmentos en vectores), se introducen (por ejemplo, transfectan) vectores que comprenden segmentos de genoma de influenza en células huésped según métodos bien conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. Por ejemplo, pueden transfectarse vectores, por ejemplo, plásmidos en células huésped, tales como células COS, células 293T o combinaciones de células COS o 293T y células MDCK, usando el reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) según las instrucciones del fabricante con el fin de producir virus reagrupados, etc. Por tanto, en un ejemplo, se introduce aproximadamente 1 μ g de cada vector en una población de células huésped con aproximadamente 2 μ l de TransIT-LT1 diluidos en 160 μ l de medio, preferiblemente medio libre de suero, en un volumen total de 200 μ l. Se incuban las mezclas de ADN:reactivo de transfección a temperatura ambiente durante 45 minutos seguido por adición de 800 μ l de medio. Se añade la mezcla de transfección a las células huésped, y se cultivan las células tal como se describe mediante otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, para la producción de virus recombinantes o reagrupados en cultivo celular, se mezclan vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos de genoma (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 μ l de TransIT-LT1 y se transfectan en células huésped. Opcionalmente, se sustituye el medio que contiene suero antes de la transfección por medio libre de suero, por ejemplo, Opti-MEM I, y se incuba durante 4-6 horas.

60 Alternativamente, puede emplearse electroporación para introducir tales vectores que incorporan segmentos de genoma de influenza en células huésped. Por ejemplo, vectores de plásmido que incorporan un virus influenza A o influenza B se introducen favorablemente en células Vero usando electroporación según el siguiente procedimiento.

En resumen, se resuspenden aproximadamente 5×10^6 células Vero, por ejemplo, hechas crecer en medio de Eagle modificado (MEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), en 0,4 ml de OptiMEM y se colocan en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 μ l a las células en la cubeta, que entonces se mezclan suavemente dando golpecitos. Se realiza la electroporación según las instrucciones del fabricante (por ejemplo, BioRad Gene Pulser II con Capacitance Extender Plus conectado) a 300 voltios, 950 microfaradios con un tiempo constante de entre 28-33 mseg. Las células vuelven a mezclarse dando golpecitos suaves y aproximadamente 1-2 minutos tras la electroporación se añaden 0,7 ml de MEM con FBS al 10% directamente a la cubeta. Entonces se transfieren las células a dos pocillos de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos convencional que contiene 2 ml de MEM, FBS al 10%. Se lava la cubeta para recuperar cualquier célula restante y se divide la suspensión de lavado entre los dos pocillos. El volumen final es de aproximadamente 3,5 ml. Entonces se incuban las células en condiciones permisivas para el crecimiento viral, por ejemplo, a aproximadamente 33°C para cepas adaptadas al frío.

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

Se elige opcionalmente una cepa de célula huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada del modo deseado. Tales modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional de la proteína, que escinde una forma precursora para dar una forma madura, es algunas veces importante para corregir la inserción, el plegamiento y/o la función. Adicionalmente, también es importante la ubicación apropiada dentro de una célula huésped (por ejemplo, en la superficie de la célula). Diferentes células huésped tales como COS, CHO, BHK, MDCK, 293, 293T, COS7, etc. tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraducionales y pueden elegirse para garantizar el procesamiento y la modificación correctos de la presente proteína foránea introducida.

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

Las células huésped transformadas con una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento se cultivan opcionalmente en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. Las células que expresan dicha proteína pueden clasificarse, aislarse y/o purificarse. La proteína o fragmento de la misma producido por una célula recombinante puede secretarse, unirse a la membrana o retenerse intracelularmente, dependiendo de la secuencia (por ejemplo, dependiendo de proteínas de fusión que codifican para una señal de retención en la membrana o similar) y/o el vector usado.

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

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el producto expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo para la producción de anticuerpos, se emplean favorablemente vectores que dirigen la expresión a alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión y clonación de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia codificante de interés, por ejemplo, secuencias que comprenden las encontradas en el presente documento, etc., puede ligarse en el vector en marco con secuencias para la traducción amino terminal que se inicia con metionina y los 7 residuos posteriores de beta-galactosidasa que producen una proteína de fusión de beta-galactosidasa catalíticamente activa; vectores pIN (Van Heeke & Schuster (1989) J Biol Chem 264:5503-5509); vectores pET (Novagen, Madison WI); y similares. De manera similar, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden usarse

varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH para la producción de los productos de expresión deseados. Para revisiones, véase Ausubel, citado a continuación, y Grant *et al.*, (1987); *Methods in Enzymology* 153:516-544.

Hibridación de ácidos nucleicos

5 Puede usarse hibridación comparativa para identificar ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5-6) incluyendo variaciones conservativas de ácidos nucleicos descritos en el presente documento. Este método de hibridación comparativa es un método preferido de distinción de ácidos nucleicos. Además, ácidos nucleicos diana que hibridan con los ácidos nucleicos representados por los mostrados en el presente documento en condiciones de alta, ultra alta y ultra-ultra alta rigurosidad, son características de la descripción. Los ejemplos de tales ácidos nucleicos incluyen aquellos con una o unas cuantas sustituciones de ácido nucleico silenciosas o conservativas en comparación con una secuencia de ácido nucleico dada.

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

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

30 Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios sobre un filtro en una transferencia de tipo Southern o Northern es un 50% de formalina con 1 mg de heparina a 42°C, llevándose a cabo la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas comprende un lavado con 0,2x SSC a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, citado a continuación, para una descripción del tampón de SSC y otros parámetros de hibridación de ácidos nucleicos). A menudo, al lavado de alta rigurosidad le precede un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad es 2x SSC a 40°C durante 15 minutos. En general, una razón señal - ruido de 5x (o superior) a la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica.

40 Tras la hibridación, pueden eliminarse los ácidos nucleicos no hibridados mediante una serie de lavados, cuya rigurosidad puede ajustarse dependiendo de los resultados deseados. Las condiciones de lavado de baja rigurosidad (por ejemplo, usando concentración de sal superior y temperatura inferior) aumentan la sensibilidad, pero pueden producir señales de hibridación no específicas y señales de fondo altas. Las condiciones de rigurosidad superior (por ejemplo, usando concentración de sal inferior y temperatura superior que está más cerca de la T_m) disminuyen la señal de fondo, normalmente con la señal específica restante específicamente. Véase, también, Rapley, R. y Walker, J.M. eds., *Molecular Biomechanics Handbook* (Humana Press, Inc. 1998).

45 "Condiciones de lavado de hibridación rigurosa" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones de tipo Southern y Northern dependen de la secuencia, y son diferentes bajo parámetros medioambientales diferentes. Se encuentra una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993), citado anteriormente, y en Hames y Higgins, 1 y 2. Las condiciones de lavado e hibridación rigurosas pueden determinarse fácilmente de manera empírica para cualquier ácido nucleico de prueba. Por ejemplo, al determinar las condiciones de lavado e hibridación altamente rigurosas, las condiciones de lavado e hibridación se aumentan gradualmente (por ejemplo, aumentando la temperatura, disminuyendo la concentración de sal, aumentando la concentración de detergente y/o aumentando la concentración de disolventes orgánicos tales como formalina en la hibridación y el lavado), hasta que se cumple un conjunto seleccionado de criterios. Por ejemplo, las condiciones de lavado e hibridación se aumentan gradualmente hasta que una sonda se une a una diana complementaria perfectamente apareada con una razón señal - ruido que es al menos 5x tan alta como la observada para la hibridación de la sonda con una diana no apareada.

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

proporcionados en las listas de secuencias en el presente documento.

Se seleccionan condiciones "muy rigurosas" para que sean iguales al punto de fusión térmica (T_m) para una sonda particular. La T_m es la temperatura (a pH y fuerza iónica definidos) a la que el 50% de la secuencia de prueba hibrida con una sonda perfectamente apareada. Para los fines de la presente descripción, generalmente, se seleccionan condiciones de hibridación y lavado "altamente rigurosas" para que sean aproximadamente 5°C inferiores a la T_m para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos (tal como se indica a continuación, también puede hacerse referencia a condiciones altamente rigurosas en términos comparativos). Pueden identificarse secuencias diana que están estrechamente relacionadas o son idénticas a la secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, "sonda") en condiciones rigurosas o altamente rigurosas. Condiciones de rigurosidad inferior son apropiadas para secuencias que son menos complementarias.

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

Al determinar las condiciones de hibridación y lavado rigurosas o altamente rigurosas (o incluso hibridación más rigurosa), las condiciones de hibridación y lavado se aumentan gradualmente (por ejemplo, aumentando la temperatura, disminuyendo la concentración de sal, aumentando la concentración de detergente y/o aumentando la concentración de disolventes orgánicos, tales como formamida, en la hibridación o el lavado), hasta que se cumple un conjunto seleccionado de criterios. Por ejemplo, las condiciones de hibridación y lavado se aumentan gradualmente hasta que una sonda que comprende una o más secuencias de polinucleótido de la descripción, por ejemplo, secuencias o subsecuencias únicas seleccionadas de las facilitadas en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 5-6) y/o secuencias de polinucleótido complementarias, se unen a una diana complementaria perfectamente apareada (de nuevo, un ácido nucleico que comprende una o más secuencias o subsecuencias de ácido nucleico seleccionadas de las facilitadas en el presente documento y/o secuencias de polinucleótido complementarias de las mismas), con una razón señal - ruido que es al menos 2x (y opcionalmente 5x, 10x o 100x o más) tan alta como la observada para la hibridación de la sonda con una diana no apareada (por ejemplo, una secuencia de polinucleótido que comprende una o más secuencias o subsecuencias seleccionadas de secuencias de influenza conocidas presentes en bases de datos públicas tales como GenBank en el momento de la presentación, y/o secuencias de polinucleótido complementarias de las mismas), según se desee.

Usando los polinucleótidos descritos en el presente documento, o subsecuencias de los mismos, pueden obtenerse ácidos nucleicos diana novedosos. Por ejemplo, tales ácidos nucleicos diana incluyen secuencias que hibridan en condiciones rigurosas con una sonda oligonucleotídica única correspondiente a cualquiera de los polinucleótidos de SEQ ID NO: 5-6).

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

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

Clonación, mutagénesis y expresión de biomoléculas de interés

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

También se describen en el presente documento diversos tipos de mutagénesis, por ejemplo, para producir y/o aislar, por ejemplo, moléculas de HA y/o NA novedosas o recién aisladas y/o para modificar/mutar adicionalmente

los polipéptidos (por ejemplo, moléculas de HA y/o NA como en la SEQ ID NO: 15-16 descrita en el presente documento. Incluyen, pero no se limitan, mutagénesis puntual aleatoria, dirigida al sitio, recombinación homóloga (intercambio de ADN), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada por fosforotioato, mutagénesis usando ADN bicatenario incompleto, o similares. Métodos adecuados adicionales incluyen reparación de apareamientos erróneos puntuales, mutagénesis usando cadenas de huésped con reparación deficiente, restricción-selección y restricción-purificación, mutagénesis por delección, mutagénesis mediante síntesis génica total, reparación de rotura de cadena doble y similares. También se describe en el presente documento la mutagénesis, por ejemplo, que implica constructos quiméricos. La mutagénesis puede guiarse mediante información conocida de la molécula que se produce de manera natural o la molécula que se produce de manera natural alterada o mutada, por ejemplo, mediante comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina o similares.

Los textos anteriores y los ejemplos encontrados en el presente documento describen estos procedimientos, al igual que las siguientes publicaciones (y bibliografía citada dentro de ellas): Sieber, *et al.*, *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); Ling *et al.*, *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, *Anal Biochem* 254(2): 157-178 (1997); Dale *et al.*, *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, *Methods Mol Biol* 57:369-374 (1996); 1. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acid Res* 23, 3067-8 (1995); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Bass *et al.*, *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, *Science* 242:240-245 (1988); Fritz *et al.*, *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions *in vitro**, *Nucl Acids Res* 16: 6987-6999 (1988); Kramer *et al.*, *Improved enzymatic *in vitro* reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, *Nucl Acids Res* 16: 7207 (1988); Sakamar y Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, *Nucl Acids Res* 14: 6361-6372 (1988); Sayers *et al.*, *Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl Acids Res* 16:791-802 (1988); Sayers *et al.*, *Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in presence of ethidium bromide*, (1988) *Nucl Acids Res* 16: 803-814; Carter, *Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Methods in Enzymol* 154: 382-403 (1987); Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, *Methods in Enzymol* 154:350-367 (1987); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, en *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlín) (1987); Kunkel *et al.*, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Methods in Enzymol* 154, 367-382 (1987); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, *Methods in Enzymol* 154: 329-350 (1987); Carter, *Site-directed mutagenesis*, *Biochem J* 237:1-7 (1986); Eghtedarzadeh & Henikoff, *Use of oligonucleotides to generate large deletions*, *Nucl Acids Res* 14: 5115 (1986); Mandeck, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 7177-7181 (1986); Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl Acids Res* 14: 9679-9698 (1986); Wells *et al.*, *Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin*, *Phil Trans R Soc Lond A* 317: 415-423 (1986); Botstein & Shortle, *Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis*, *Science* 229:1193-1201(1985); Carter *et al.*, *Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Nucl Acids Res* 13: 4431-4443 (1985); Grundström *et al.*, *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, *Nucl Acids Res* 13: 3305-3316 (1985); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:488-492 (1985); Smith, *In vitro mutagenesis*, *Ann Rev Genet* 19:423-462(1985); Taylor *et al.*, *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, *Nucl Acids Res* 13: 8749-8764 (1985); Taylor *et al.*, *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*, *Nucl Acids Res* 13: 8765-8787 (1985); Wells *et al.*, *Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, *Gene* 34:315-323 (1985); Kramer *et al.*, *The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction*, *Nucl Acids Res* 12: 9441-9456 (1984); Kramer *et al.*, *Point Mismatch Repair*, *Cell* 38:879-887 (1984); Nambiar *et al.*, *Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein*, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, *Methods in Enzymol* 100:468-500 (1983); y Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, *Nucl Acids Res* 10:6487-6500 (1982). Detalles adicionales sobre muchos de los métodos anteriores pueden encontrarse en *Methods in Enzymol* Volumen 154, que también describe controles útiles para problemas de corrección de errores con diversos métodos de mutagénesis, aislamiento de genes, expresión y otros.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, para su uso en mutagénesis por ejemplo mutando bibliotecas de moléculas de HA y/o NA o alterándolas, normalmente se sintetizan químicamente según el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts* 22(20):1859-1862, (1981) por ejemplo usando un sintetizador automatizado, tal como se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acid Res*, 12:6159-6168 (1984).

Además, esencialmente puede adaptarse o encargarse de manera convencional cualquier ácido nucleico a partir de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company

(mrcr@oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), ExpressGen Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras. De manera similar, también pueden encargarse a medida péptidos y anticuerpos a partir de cualquiera de una variedad de fuentes, tales como PeptidoGenic (disponible en pkim@ccnet.com), HTI Bio-products, Inc. (www.htibio.com), BMA Biomedicals Ltd. (R.U.), Bio.Synthesis, Inc., y muchas otras.

También se describen en el presente documento células huésped y organismos que comprenden una molécula de HA y/o NA u otro polipéptido y/o ácido nucleico de por ejemplo, SEQ ID NO 5-6. Las células huésped se modifican mediante ingeniería genética (por ejemplo, se transforman, transducen o transfectan) con los vectores descritos en el presente documento, que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en células y/o microorganismos mediante métodos convencionales que incluyen electroporación (véase, From *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 5824 (1985)), infección mediante vectores virales, penetración balística a alta velocidad mediante partículas pequeñas con el ácido nucleico o bien dentro de la matriz de perlas o partículas pequeñas, o bien sobre la superficie (Klein *et al.*, Nature 327, 70-73 (1987)). Berger, Sambrook y Ausubel proporcionan una variedad de métodos de transformación adecuados. Véase anteriormente.

Están disponibles varios métodos bien conocidos de introducción de ácidos nucleicos diana en células bacterianas, pudiendo usarse cualquiera de ellos en la presente invención. Éstos incluyen: fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo con proyectiles e infección con vectores virales, etc. Pueden usarse células bacterianas para amplificar el número de plásmidos que contienen constructos de ADN de esta invención. Las bacterias se hacen crecer hasta fase logarítmica y pueden aislarse los plásmidos dentro de las bacterias mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, están disponibles comercialmente una multitud de kits para la purificación de plásmidos procedentes de bacterias (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™, de Stratagene; y, QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan entonces adicionalmente para producir otros plásmidos, se usan para transfectar células o se incorporan en vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen secuencias terminadoras de transcripción y traducción, secuencias de inicio de transcripción y traducción, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas, o procariotas, o ambos, (por ejemplo, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación y la integración en procariotas, eucariotas, u opcionalmente ambos. Véanse, Giliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, *et al.*, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B., *et al.*, Protein Expr Purif 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (todos citados anteriormente). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para la clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophages (1992) Ghema *et al.* (eds.) publicado por la ATCC. Procedimientos básicos adicionales para secuenciación, clonación y otros aspectos de biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes también se encuentran en Watson *et al.* (1992) Recombinant DNA, Segunda edición, Scientific American Books, NY. Véase, anteriormente. Vectores adicionales útiles con las secuencias en el presente documento se ilustran anteriormente en la sección relativa a la producción de virus influenza para vacunas y la bibliografía citada en ella.

PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE POLIPÉPTIDOS

Tras la transducción de una cepa o línea celular huésped adecuada y el crecimiento de las células huésped hasta una densidad celular apropiada, se induce el promotor seleccionado mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. En algunas realizaciones, se recupera entonces un producto polipeptídico secretado, por ejemplo, un polipéptido de HA y/o NA en forma de proteína de fusión secretada, etc., del medio de cultivo. En otras realizaciones, se produce una partícula de virus de la invención que contiene un polipéptido de HA y/o NA procedente de la célula. Alternativamente, las células pueden recogerse mediante centrifugación, alterarse mediante medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante puede retenerse para su purificación adicional. Las células eucariotas o microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden alterarse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisis celular, u otros métodos que conocen bien los expertos en la técnica. Adicionalmente, pueden utilizarse células que expresan un producto polipeptídico de HA y/o NA descrito en el presente documento sin separar el polipéptido de la célula. En tales situaciones, el polipéptido se expresa opcionalmente sobre la superficie celular y se examina por tanto (por ejemplo, teniendo moléculas de HA y/o NA por ejemplo, que comprenden proteínas de fusión o similares) sobre la superficie celular, etc.

Los polipéptidos expresados pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas de marcaje conocidos por los expertos en la técnica), cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina.

Pueden usarse etapas de replegamiento de proteínas, según se desee, para completar la configuración de la proteína madura. Además, puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en las etapas de purificación finales. Además de la bibliografía mencionada en el presente documento, se conocen bien en la técnica una variedad de métodos de purificación, incluyendo, por ejemplo, los explicados en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bollag *et al.* (1996) *Protein Methods*, 2ª Edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ; Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. Segunda edición, Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.

Cuando los polipéptidos expresados se producen en virus, los virus se recuperan normalmente del medio de cultivo, en el que se han hecho crecer las células infectadas (transfectadas). Normalmente, el medio bruto se aclara antes de la concentración de los virus influenza. Métodos comunes incluyen ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, el medio bruto procedente de cultivos infectados puede aclararse en primer lugar mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para eliminar desechos celulares y otra materia particulada grande, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Opcionalmente, luego se centrifuga el sobrenadante del medio aclarado para que sedimenten los virus influenza, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Tras la suspensión del sedimento de virus en un tampón apropiado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, se concentra el virus mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre sacarosa (60%-12%) o tartrato de potasio (50%-10%). Son adecuados gradientes o bien continuos o bien escalonados, por ejemplo, un gradiente de sacarosa de entre el 12% y el 60% en cuatro etapas del 12%. Los gradientes se centrifugan a una velocidad y durante un tiempo suficientes para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación. Alternativamente, y para aplicaciones comerciales a mayor escala, el virus se somete a elutriación a partir de gradientes de densidad usando un rotor de centrifuga zonal en modo continuo. Detalles adicionales suficientes para guiar a un experto a través de la preparación de virus influenza procedentes de cultivo tisular se proporcionan, por ejemplo, en Furminger. *Vaccine Production*, en Nicholson *et al.* (eds.) *Textbook of Influenza*, págs. 324-332; Merten *et al.* (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*, en Cohen & Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* págs. 141-151, y patente de Estados Unidos n.º 5.690.937. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80°C en presencia de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) como estabilizador.

Alternativamente, pueden emplearse sistemas de transcripción/traducción libres de células para producir polipéptidos que comprenden una secuencia o subsecuencia de aminoácidos o de, por ejemplo, las secuencias facilitadas en el presente documento tal como SEQ ID NO: 15-16, o codificarse mediante secuencias de polinucleótido, por ejemplo, SEQ ID NO: 5-6. Están comercialmente disponibles varios sistemas de transcripción y traducción *in vitro*. Una guía general para protocolos de transcripción y traducción *in vitro* se encuentra en Tymms (1995) *In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology*, Volumen 37, Garland Publishing, NY.

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

Aminoácidos modificados

Los polipéptidos expresados descritos en el presente documento pueden contener uno o más aminoácidos modificados. La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, (a) el aumento de la semivida en suero del polipéptido, (b) la reducción/aumento de la antigenicidad del polipéptido, (c) el aumento de la estabilidad en almacenamiento del polipéptido, etc. El(los) aminoácido(s) se modifican, por ejemplo, conjuntamente con la traducción o tras la traducción durante la producción recombinante (por ejemplo, glicosilación asociada al extremo N-terminal en motivos N-XS/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican mediante medios sintéticos (por ejemplo, a través de pegilación).

Los ejemplos no limitativos de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranylgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado, y similares, así como aminoácidos modificados mediante conjugación con, por ejemplo, restos lipídicos u otros agentes de derivatización orgánicos. Hay multitud de referencias bibliográficas adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos en la bibliografía. Los protocolos ejemplo se encuentran en Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Human Press, Towata, NJ.

Proteínas de fusión

También se describen en el presente documento proteínas de fusión que comprenden fusiones de las secuencias descritas en el presente documento (por ejemplo, que codifican para polipéptidos de HA y/o NA tal como se facilita a modo de ejemplo mediante las SEQ ID NO: 15-16) con, por ejemplo, inmunoglobulinas (o partes de las mismas), secuencias que codifican para, por ejemplo, GFP (proteína fluorescente verde), u otros marcadores similares, etc. Las proteínas de fusión se usan opcionalmente para, por ejemplo, aplicaciones similares (incluyendo, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas, profilácticas, diagnósticas, experimentales, etc., tal como se describe en el presente documento) a las de las proteínas de no fusión descritas en el presente documento. Además de la fusión con secuencias de inmunoglobulina y secuencias de marcador, las proteínas descritas en el presente documento también se fusionan opcionalmente con, por ejemplo, secuencias que permiten la clasificación de las proteínas de fusión y/o el direccionamiento de las proteínas de fusión hacia regiones, tipos celulares específicos, etc.

Anticuerpos

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

Pueden generarse anticuerpos específicos para los polipéptidos descritos en el presente documento mediante métodos bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab.

Los polipéptidos no requieren actividad biológica para la producción de anticuerpos (por ejemplo, no se requiere hemaglutinina o neuraminidasa funcionales de longitud completa). Sin embargo, el polipéptido u oligopéptido debe ser antigénico. Los péptidos usados para inducir anticuerpos específicos normalmente tienen una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 4 aminoácidos, y a menudo de al menos 5 ó 10 aminoácidos. Pueden fusionarse extensiones cortas de un polipéptido con otra proteína, tal como hemocianina de lapa californiana y un anticuerpo producido frente a la molécula química.

Los expertos en la técnica conocen numerosos métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales y pueden adaptarse para producir anticuerpos específicos para los polipéptidos descritos en el presente documento y/o codificarse por la secuencia de polinucleótido descrita en el presente documento etc. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY; Paul (ed.) (1998) *Fundamental Immunology*, Cuarta Edición, Lippincott-Raven, Lippincott Williams & Wilkins; Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY; Stites *et al.* (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y bibliografías citadas en ellos; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY; y Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497. Otras técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos incluyen la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares. Véanse, Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; y Ward, *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546. Los antisueros y anticuerpos monoclonales y policlonales específicos se unirán habitualmente con una K_D de, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 μM , al menos aproximadamente 0,01 μM o mejor y normalmente al menos aproximadamente 0,001 μM o mejor.

Para ciertas aplicaciones terapéuticas, son deseables anticuerpos humanizados. Métodos detallados para la preparación de anticuerpos quiméricos (humanizados) pueden encontrarse en la patente estadounidense 5.482.856. Detalles adicionales sobre la humanización y otras técnicas de producción y modificación por ingeniería genética de anticuerpos pueden encontrarse en Borrebaeck (ed.) (1995) *Antibody Engineering*, 2ª Edición, Freeman and Company, NY (Borrebaeck); McCafferty *et al.* (1996) *Antibody Engineering, A Practical Approach* IRL en Oxford Press, Oxford, Inglaterra (McCafferty), y Paul (1995) *Antibody Engineering Protocols* Humana Press, Towata, NJ (Paul). Detalles adicionales en cuanto a procedimientos específicos pueden encontrarse, por ejemplo, en Ostberg *et al.* (1983), *Hybridoma* 2: 361-367, Ostberg, patente estadounidense n.º 4.634.664, y Engelman *et al.*, patente estadounidense n.º 4.634.666.

Definición de polipéptidos mediante inmunorreactividad

También se describen en el presente documento la generación de antisueros que se unen específicamente a los polipéptidos descritos en el presente documento así como los polipéptidos que se unen mediante tales antisueros.

Por ejemplo, se describen polipéptidos (por ejemplo, moléculas de HA y/o NA) que se unen específicamente a o que son específicamente inmunorreactivos con un anticuerpo o antisueros generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una o más de las secuencias facilitadas en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 15-16), etc. Para eliminar la reactividad cruzada con otros homólogos, el anticuerpo o antisuero se extraen con las moléculas de HA y/o NA encontradas en bases de datos públicas en el momento de presentar, por ejemplo, el(los) polipéptido(s) "control". Cuando las otras secuencias control

corresponden a un ácido nucleico, se genera un polipéptido codificado por el ácido nucleico y se usa para fines de extracción de anticuerpo/antisueros.

5 En un formato típico, el inmunoensayo usa un antisuero policlonal que se produjo contra uno o más polipéptidos que comprenden una o más de las secuencias correspondientes a las secuencias en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 15-16), etc. o una subsecuencia sustancial del mismo (es decir, al menos aproximadamente el 30% de la secuencia de longitud completa proporcionada). El conjunto de inmunógenos polipeptídicos potenciales derivados de las presentes secuencias se denomina colectivamente en lo sucesivo "polipéptidos inmunogénicos". El antisuero resultante se selecciona opcionalmente para que tenga baja reactividad cruzada contra homólogos de hemaglutinina y/o neuraminidasa control y se elimina cualquier reactividad cruzada de este tipo, por ejemplo, mediante inmunoabsorción, con uno o más de los homólogos de hemaglutinina y neuraminidasa control, antes del uso del antisuero policlonal en el inmunoensayo.

15 Con el fin de producir antisueros para su uso en un inmunoensayo, se produce y se purifica uno o más de los polipéptidos inmunogénicos tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, puede producirse una proteína recombinante en una célula recombinante. Se inmuniza una variedad endógama de ratones (usada en este ensayo porque los resultados son más reproducibles debido a la identidad genética virtual de los ratones) con la(s) proteína(s) inmunogénica(s) en combinación con un adyuvante convencional, tal como el adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización de ratones convencional (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción convencional de generación de anticuerpos, formatos de inmunoensayos y condiciones que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica). Pueden encontrarse bibliografía y comentarios adicionales de anticuerpos en el presente documento y pueden aplicarse en este caso para definir polipéptidos mediante inmunorreactividad. Alternativamente, uno o más polipéptido(s) sintético(s) o recombinante(s) derivados de las secuencias dadas a conocer en el presente documento se conjuga(n) con una proteína portadora y se usa(n) como inmunógeno.

25 Se recogen sueros policlonales y se titulan contra el polipéptido inmunogénico en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con una o más de las proteínas inmunogénicas inmovilizadas sobre un soporte sólido. Se seleccionan antisueros policlonales con un título de 10^5 o mayor, se reúnen y se extraen con el(los) polipéptido(s) de hemaglutinina y/o neuraminidasa control para producir antisueros policlonales titulados, reunidos, extraídos.

30 Los antisueros policlonales titulados, reunidos, extraídos, se someten a prueba para determinar la reactividad cruzada contra el(los) homólogo(s) control en un inmunoensayo comparativo. En este ensayo comparativo, se determinan condiciones de unión discriminatorias para los antisueros policlonales, titulados, extraídos, lo que da como resultado al menos aproximadamente una razón de señal con respecto a ruido de 5-10 veces superior para la unión de los antisueros policlonales titulados a los polipéptidos inmunogénicos, en comparación con la unión a los homólogos control. Es decir, la rigurosidad de la reacción de unión se ajusta mediante la adición de competidores no específicos tales como albúmina o leche desnatada en polvo y/o mediante el ajuste de las condiciones salinas, la temperatura y/o similares. Estas condiciones de unión se usan en ensayos posteriores para determinar si un polipéptido de prueba (un polipéptido que se compara con los polipéptidos inmunogénicos y/o los polipéptidos control) se une específicamente mediante los antisueros policlonales extraídos reunidos. En particular, los polipéptidos de prueba que muestran al menos una razón de señal con respecto a ruido de 2-5x superior que los homólogos receptores control en condiciones de unión discriminatorias, y al menos aproximadamente un $\frac{1}{2}$ de razón de señal con respecto a ruido en comparación con el(los) polipéptido(s) inmunogénico(s), comparten una similitud estructural sustancial con el polipéptido inmunogénico en comparación con el receptor conocido, etc.

45 En otro ejemplo, se usan inmunoensayos en el formato de unión competitiva para la detección de un polipéptido de prueba. Por ejemplo, tal como se ha observado, se eliminan los anticuerpos de reactividad cruzada de la mezcla de antisueros reunidos mediante inmunoabsorción con los polipéptidos control. El(los) polipéptido(s) inmunogénico(s) se inmoviliza(n) entonces a un soporte sólido que se expone a los antisueros reunidos extraídos. Las proteínas de prueba se añaden al ensayo para competir por unirse a los antisueros extraídos reunidos. La capacidad de la(s) proteína(s) de prueba para competir por unirse a los antisueros extraídos reunidos en comparación con la(s) proteínas(s) inmovilizada(s) se compara con la capacidad del(de los) polipéptido(s) inmunogénico(s) añadido(s) al ensayo para competir por unirse (los polipéptidos inmunogénicos compiten eficazmente con los polipéptidos inmunogénicos inmovilizados por unirse a los antisueros reunidos). Se calcula el porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas de prueba, usando cálculos convencionales.

55 En un ensayo paralelo, se determina opcionalmente la capacidad de la(s) proteína(s) control para competir por unirse a los antisueros extraídos reunidos en comparación con la capacidad del(de los) polipéptido(s) inmunogénico(s) para competir por unirse a los antisueros. De nuevo, se calcula el porcentaje de reactividad cruzada para el(los) polipéptido(s) control, usando cálculos convencionales. Cuando el porcentaje de reactividad cruzada es al menos 5-10x tan alto para los polipéptidos de prueba en comparación con el(los) polipéptido(s) control y/o cuando la unión de los polipéptidos de prueba está aproximadamente en el intervalo de la unión de los polipéptidos inmunogénicos, se dice que los polipéptidos de prueba se unen específicamente a los antisueros extraídos reunidos.

60 En general, los antisueros inmunoabsorbidos y reunidos pueden usarse en un inmunoensayo de unión competitiva

- tal como se describe en el presente documento para comparar cualquier polipéptido de prueba con el(los) polipéptido(s) inmunogénico(s) y/o control. Con el fin de realizar esta comparación, se someten a ensayo los polipéptidos inmunogénicos, de prueba y control en un amplio intervalo de concentraciones y se determina la cantidad de cada polipéptido requerida para inhibir el 50% de la unión de los antisueros extraídos a, por ejemplo, una proteína inmovilizada inmunogénica, de prueba o control, usando técnicas convencionales. Si la cantidad del polipéptido de prueba requerida en el ensayo competitivo es menos de dos veces la cantidad del polipéptido inmunogénico que se requiere, entonces se dice que el polipéptido de prueba se une específicamente a un anticuerpo generado frente a la proteína inmunogénica, siempre que la cantidad sea al menos aproximadamente 5-10x tan alta como para el polipéptido control.
- Como una determinación adicional de la especificidad, el antisuero reunido se inmuoabsorbe opcionalmente de manera completa con el(los) polipéptido(s) inmunogénico(s) (en lugar de con el(los) polipéptido(s) control) hasta que se detecte poca o ninguna unión de los antisueros reunidos extraídos con polipéptido inmunogénico resultantes al(los) polipéptido(s) inmunogénico(s) usado(s) en la inmuoabsorción. Este antisuero completamente inmuoabsorbido se somete entonces a prueba para determinar la reactividad con el polipéptido de prueba. Si se observa poca o ninguna reactividad (es decir, no más de 2x la razón de señal con respecto a ruido observada para la unión de los antisueros completamente inmuoabsorbidos al polipéptido inmunogénico), entonces el polipéptido de prueba se une específicamente mediante los antisueros provocados por la proteína inmunogénica.

VARIANTES DE SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO Y POLIPÉPTIDO

Variaciones silenciosas

- Debido a la degeneración del código genético, se produce opcionalmente cualquiera de una variedad de secuencias de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos descritos en el presente documento, pudiendo portar algunas de ellas niveles inferiores de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de HA y NA en el presente documento. A continuación se facilita una tabla de codones típicos que especifica el código genético, encontrada en muchos textos de biología y bioquímica.

Tabla 1

Tabla de codones

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

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

- Tales “variaciones silenciosas” son una especie de “variaciones modificadas de manera conservativa” comentadas a continuación. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto ATG, que normalmente es el único codón para metionina, y TTG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse mediante técnicas convencionales de manera que codifique para un polipéptido funcionalmente idéntico. Por consiguiente,

5 cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido está implícita en cualquier secuencia descrita. La descripción, por tanto, proporciona explícitamente todas y cada una de las posibles variaciones de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento que podrían realizarse seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codones. Estas combinaciones se realizan según el código genético de tripletes convencional (por ejemplo, tal como se expone en la tabla 1, o tal como está comúnmente disponible en la técnica) tal como se aplica a la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de hemaglutinina o neuraminidasa descrito en el presente documento. Todas estas variaciones de cada ácido nucleico en el presente documento se proporcionan específicamente y se describen teniendo en cuenta la secuencia en combinación con el código genético. Un experto en la técnica es completamente capaz de realizar estas sustituciones silenciosas usando los métodos en el presente documento.

Variaciones conservativas

15 Debido a la degeneración del código genético, las “sustituciones silenciosas” (es decir, sustituciones en una secuencia de ácido nucleico que no dan como resultado una alteración en un polipéptido codificado) son una característica implícita de cada secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento que codifica para un aminoácido.

Las “variaciones conservativas” de una secuencia de ácido nucleico particular se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas. Finalmente, la adición de secuencias que no alteran la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico, tal como la adición de una secuencia no funcional, es una variación conservativa del ácido nucleico básico.

Subsecuencias únicas de polipéptido y polinucleótido

25 También se describe en el presente documento un ácido nucleico que comprende una subsecuencia única en un ácido nucleico seleccionada de la secuencia de moléculas de HA y/o NA dada a conocer en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 5-6. La subsecuencia única es única en comparación con un ácido nucleico correspondiente a ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, los encontrados en GenBank u otras bases de datos públicas similares en el momento de la presentación. La alineación puede realizarse usando, por ejemplo, la herramienta BLAST configurada con parámetros por defecto. Cualquier subsecuencia única es útil, por ejemplo, como sonda para identificar los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. Véase anteriormente.

30 De manera similar, se describe en el presente documento un polipéptido que comprende una subsecuencia única en un polipéptido seleccionada de la secuencia de moléculas de HA y/o NA dada a conocer en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 15-16. En este caso, la subsecuencia única es única en comparación con un polipéptido correspondiente a, por ejemplo, el aminoácido correspondiente a las secuencias de polinucleótido encontradas en, por ejemplo, GenBank u otras bases de datos públicas similares en el momento de la presentación.

35 Además se describen ácidos nucleicos diana que hibridan en condiciones rigurosas con un oligonucleótido codificante único que codifica para una subsecuencia única en un polipéptido seleccionada de las secuencias de moléculas de HA y/o NA descritas en el presente documento, siendo la subsecuencia única en comparación con un polipéptido correspondiente a cualquiera de los polipéptidos de control (secuencias de, por ejemplo, los ácidos nucleicos correspondientes a los encontrados en, por ejemplo, GenBank u otras bases de datos públicas similares en el momento de la presentación). Las secuencias únicas se determinan tal como se indicó anteriormente.

Comparación, identidad y homología de secuencias

40 Los términos “idéntico” o “identidad” en porcentaje, en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima, tal como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos más adelante (u otros algoritmos disponibles para los expertos) o mediante inspección visual.

45 El término “sustancialmente idéntico,” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (por ejemplo, ADN que codifican para una molécula de HA o NA, o la secuencia de aminoácidos de una molécula de HA o NA) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de residuos de nucleótido o aminoácido de al menos aproximadamente el 90%, preferiblemente el 91%, lo más preferiblemente el 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% o más, cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima, tal como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Normalmente se considera que tales secuencias “sustancialmente idénticas” son homólogas, sin hacer referencia a los ancestros reales. Preferiblemente, existe “identidad sustancial” a lo largo de una región de las secuencias de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 200 residuos de longitud, más preferiblemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 250 residuos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de al menos aproximadamente 300 residuos, 350 residuos, 400 residuos, 425 residuos, 450 residuos, 475 residuos, 480 residuos, 490 residuos, 495 residuos, 499 residuos, 500 residuos, 502 residuos, 559 residuos, 565 residuos, o 566 residuos, o a lo largo de la longitud completa de las dos secuencias que van a compararse.

Para la comparación de secuencias y la determinación de la homología, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia si es necesario, y se diseñan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces la identidad de secuencias en porcentaje para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados del programa.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv Appl Math* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, *J Mol Biol* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o mediante inspección visual (véase generalmente, Ausubel *et al.*, citado anteriormente).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia e identidad de secuencia en porcentaje es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J Mol Biol* 215:403-410 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que o bien corresponden o bien satisfacen alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabras vecinas (véase, Altschul *et al.*, citado anteriormente). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye por debajo de la cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa llega hasta cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W , T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un punto de corte de 100, $M=5$, $N=4$, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff & Henikoff (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10915).

Además de calcular la identidad de secuencia en porcentaje, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5873-5877 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,001.

Otro ejemplo de un algoritmo de alineación de secuencias útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, por parejas. También puede representarse gráficamente un árbol que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng & Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-360. El método usado es similar al método descrito por Higgins & Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153. El programa puede alinear, por ejemplo, hasta 300 secuencias de una longitud máxima de 5.000 letras. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por parejas de las dos secuencias más similares, produciendo una agrupación de dos secuencias alineadas. Esta agrupación puede alinearse entonces con la siguiente secuencia más relacionada o agrupación de secuencias alineadas. Dos agrupaciones de secuencias pueden alinearse mediante una simple extensión de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se logra mediante una serie de alineaciones progresivas, por parejas. El programa también puede usarse para representar gráficamente un dendrograma o representación en árbol de relaciones de agrupación. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias.

Un ejemplo adicional de un algoritmo que es adecuado para múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos o ADN es el programa CLUSTALW (Thompson, J. D. *et al.* (1994) *Nucl. Acids. Res.* 22: 4673-4680). CLUSTALW realiza múltiples comparaciones por parejas entre grupos de secuencias y las reúne en una alineación múltiple basada en la homología. Las penalizaciones por apertura de hueco y extensión de hueco pueden ser, por ejemplo,

de 10 y 0,05, respectivamente. Para alineaciones de aminoácidos, puede usarse el algoritmo BLOSUM como matriz de pesos de proteínas. Véase, por ejemplo, Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.

SISTEMAS DIGITALES

5 Se describen adicionalmente sistemas digitales, por ejemplo, ordenadores, medios legibles por ordenador y sistemas integrados que comprenden cadenas de caracteres correspondientes a la información de secuencia en el presente documento para los ácidos nucleicos y polipéptidos aislados o recombinantes en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, las secuencias mostradas en el presente documento, y las diversas sustituciones silenciosas y sustituciones conservativas de las mismas. Los sistemas integrados pueden incluir además, por
10 ejemplo, equipo de síntesis de genes para obtener genes correspondientes a las cadenas de caracteres.

Pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica para detectar homología o similitud entre diferentes cadenas de caracteres (véase anteriormente), o pueden usarse para realizar otras funciones deseables tales como para controlar archivos de salida, proporcionar la base para realizar presentaciones de información incluyendo las secuencias y similares. Los ejemplos incluyen BLAST, comentado anteriormente. Los sistemas informáticos pueden
15 incluir tales programas, por ejemplo, conjuntamente con uno o más archivo(s) de datos o base(s) de datos que comprende(n) una secuencia tal como se indica en el presente documento.

Por tanto, pueden detectarse y reconocerse diferentes tipos de homología y similitud de diversa rigurosidad y longitud entre diversas secuencias o fragmentos de HA o NA, etc. en los sistemas integrados en el presente documento. Por ejemplo, se han diseñado muchos métodos de determinación de la homología para el análisis comparativo de secuencias de biopolímeros, para la "*corrección ortográfica*" en el procesamiento de textos y para la recuperación de datos de diversas bases de datos. Con comprensión de las interacciones complementarias por parejas de la doble hélice entre 4 nucleobases principales en los polinucleótidos naturales, también pueden usarse modelos que simulan la hibridación de cadenas de polinucleótidos homólogos complementarios como base de la alineación de secuencias u otras operaciones realizadas normalmente en las cadenas de caracteres correspondientes a las secuencias en el presente documento (por ejemplo, manipulaciones del procesamiento de palabras, construcción de figuras que comprenden cadenas de caracteres de secuencia o subsecuencia, tablas de salida, etc.).

Por tanto, pueden adaptarse aplicaciones de sobremesa convencionales tales como software de procesamiento de textos (por ejemplo, Microsoft Word™ o Corel WordPerfect™) y software de bases de datos (por ejemplo, software de hojas de cálculo tal como Microsoft Excel™, Corel Quattro Pro™, o programas de bases de datos tales como Microsoft Access™, Paradox™, GeneWorks™, o MacVector™ u otros programas similares) introduciendo una cadena de caracteres correspondiente a uno o más polinucleótidos y polipéptidos descritos en el presente documento (o bien ácidos nucleicos o bien proteínas, o ambos). Por ejemplo, un sistema puede incluir el software anterior que tiene la información de cadena de caracteres apropiada, por ejemplo, usado conjuntamente con una interfaz de usuario (por ejemplo, una GUI en un sistema operativo convencional tal como un sistema de Windows, Macintosh o LINUX) para manipular cadenas de caracteres correspondientes a las secuencias en el presente documento. Tal como se ha indicado, también pueden incorporarse programas de alineación especializados tales como BLAST en los sistemas descritos en el presente documento para la alineación de ácidos nucleicos o proteínas (o cadenas de caracteres correspondientes).

40 Los sistemas descritos en el presente documento incluyen normalmente un ordenador digital con conjuntos de datos introducidos en el sistema de software que comprenden cualquiera de las secuencias en el presente documento. El ordenador puede ser, por ejemplo, un PC (máquina basada en DOS™, OS2™ WINDOWS™, WINDOWSNT™, WINDOWS95™, WINDOWS2000™, WINDOWS98™, LINUX compatible con un procesador Intel x86 o Pentium, una máquina basada en MACINTOSH™, Power PC o UNIX (por ejemplo, la estación de trabajo SUN™) u otro ordenador disponible comercialmente que conozca el experto. Se dispone del software para alinear o manipular de otro modo secuencias, o puede construirse fácilmente por un experto usando un lenguaje de programación convencional tal como Visualbasic, PERL, Fortran, Basic, Java o similares.

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

El ordenador incluye normalmente software apropiado para recibir instrucciones del usuario, o bien en forma de entrada de usuario en un campo de parámetros fijados, por ejemplo, en una GUI, o bien en forma de instrucciones programadas previamente, por ejemplo, programadas previamente para una variedad de operaciones específicas diferentes. El software convierte entonces estas instrucciones en lenguaje apropiado para instruir el funcionamiento,

por ejemplo, de mecanismos o controladores de transporte apropiados para llevar a cabo la operación deseada. El software también puede incluir elementos de salida para controlar la síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo, basándose en una secuencia o una alineación de secuencias en el presente documento); comparaciones de muestras para la expresión génica diferencial, u otras operaciones.

5 **KITS Y REACTIVOS**

10 También se describe un kit. Por ejemplo, un kit contiene uno o más ácido(s) nucleico(s), polipéptido(s), anticuerpo(s) o línea(s) celular(es) descritos en el presente documento (por ejemplo, que comprenden, o con, una molécula de HA y/o NA descrita en el presente documento). El kit puede contener un ácido nucleico o polipéptido de diagnóstico, por ejemplo, un anticuerpo, conjunto de sonda, por ejemplo, como un microalineamiento de ADNc empaquetado en un envase adecuado, u otro ácido nucleico tal como uno o más vector(es) de expresión. El kit también puede comprender adicionalmente uno o más reactivos adicionales, por ejemplo, sustratos, marcadores, cebadores, para marcar productos de expresión, tubos y/u otros accesorios, reactivos para recoger muestras, tampones, cámaras de hibridación, cubreobjetos, etc. El kit comprende opcionalmente además un conjunto de instrucciones o manual de usuario que detalla los métodos preferidos de uso de los componentes del kit para el descubrimiento o la aplicación de conjuntos de diagnóstico, etc.

15 Cuando se usa según las instrucciones, el kit puede usarse, por ejemplo, para evaluar un estado o patología, para evaluar los efectos de un agente farmacéutico u otra intervención del tratamiento en la progresión de un estado o patología en una célula u organismo, o para su uso como vacuna, etc.

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

25 Adicionalmente, los kits pueden incluir uno o más sistema(s) de traducción tal como se indicó anteriormente (por ejemplo, una célula) con material de empaquetamiento apropiado, envases para contener los componentes del kit, materiales de instrucciones para poner en práctica los métodos en el presente documento y/o similares. De manera similar, pueden proporcionarse productos de los sistemas de traducción (por ejemplo, proteínas tales como moléculas de HA y/o NA) en forma de kit, por ejemplo, con envases para contener los componentes del kit, materiales de instrucciones para poner en práctica los métodos en el presente documento y/o similares.

30 Para facilitar el uso de los métodos y las composiciones de la invención, pueden empaquetarse en forma de kit cualquiera de los componentes y/o composiciones de vacuna, por ejemplo, virus reagrupado en líquido alantoico, etc., y componentes adicionales, tales como, tampón, células, medio de cultivo, útiles para el empaquetamiento y la infección de los virus influenza para fines de vacuna experimental o terapéutica. Normalmente, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para realizar los métodos de la invención, material de empaquetamiento y un envase.

Ejemplos

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

Se usaron diversas secuencias en el presente documento que comprenden las secuencias de HA/NA H5N1 para crear vacunas y virus influenza. Se alteraron las secuencias de HA en tales vacunas con respecto al tipo natural mediante la eliminación del sitio de escisión polibásico dentro de la HA. Se reagruparon las secuencias de HA/NA (en un reagrupamiento 6:2) con A/AA/6/60 (un virus *att*, *ca*, véase anteriormente).

45 Se usaron tres cepas de influenza H5N1 en este ejemplo: A/VN/1203/2004, A/HK/491/97 y A/HK/213/2003. Tales cepas también se denominan dentro de este ejemplo las cepas del 97, 03 y 04 basándose en las designaciones de sus años. La similitud en porcentaje de los genes de HA de estas tres cepas es del 95-96%. La figura 1 ilustra la modificación del sitio de escisión polibásico de una secuencia de HA a modo de ejemplo, las secuencias de HA del 04, usadas para construir los virus/vacunas. Tal como se estableció anteriormente, diversas realizaciones de la invención comprenden secuencias que tienen diferentes regiones del sitio de escisión polibásico eliminadas. Véase anteriormente.

50 Tal como se ha establecido, se usaron las secuencias de H5N1 modificadas (es decir, los genes del 97, 03 y 04 modificados) para construir virus con reagrupamiento 6:2 con A/AA/6/60. Se apreciará y se señala en otra parte en el presente documento que también podrían haberse usado otras estructuras principales deseables (por ejemplo, PR8, etc.).

55 En los reagrupamientos 6:2 de este ejemplo, las secuencias de genes de HA y NA se derivaron del virus original de

- 5 tipo natural y los genes restantes se caracterizaron mediante análisis de secuencia derivado del virus original A/AA/6/60 *ca*. Los virus reagrupados se replicaron hasta 8,0-8,5 log₁₀DICT₅₀ en huevos. Sin embargo, se apreciará que un virus tal como se reivindica en el que el log₁₀ DICT₅₀ está comprendido entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 7,5 y 8,5, o entre aproximadamente 8,0 y 8,5 también forma parte de la invención. Se limitó la capacidad de escisión de la HA modificada en los virus construidos por proteasas endógenas *in vitro* y los virus eran dependientes de tripsina (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 ug/ml hasta aproximadamente 1,0 ug/ml) para el crecimiento. Los virus construidos eran sensibles a la temperatura *in vitro*.
- 10 Los virus reagrupados H5N1 *ca* (que tienen los genes de HA del 97, 03 o 04 modificados) no fueron altamente patógenos para pollos. Por ejemplo, cuando se inocularon pollos Plymouth Rock blancos SPF de 4 semanas de edad por vía intravenosa con una dilución 1:10 de virus de reserva (10^{8-8,75} DICT₅₀/ml) y se observaron durante 10 días, se observó que 8 de 8 pollos murieron en el plazo de 1-2 días cuando se usaron H5N1 97, 03 y 04 de tipo natural, mientras que murieron 0 de 8 pollos cuando se usaron virus reagrupados H5N1 *ca*. Tal como puede observarse en la figura 2, los virus reagrupados H5N1 *ca* administrados por vía intranasal no se replicaron en pollos.
- 15 Los virus reagrupados H5N1/AA *ca* tampoco fueron letales para los ratones. Véase la figura 3, que también muestra la DICT₅₀ para las cepas de tipo natural H5N1. La figura 4 muestra que los virus reagrupados H5N1 *ca* 1997 y 2004 estaban restringidos en la replicación en ratones. La figura 5 muestra que los virus reagrupados H5N1 *ca* estaban restringidos en la replicación en pulmones de ratones.
- 20 En la figura 6 se muestra una comparación de los títulos de anticuerpos HAI séricos producidos en ratones tras una única dosis intranasal de vacuna (2003 *ca* en comparación con 2003 de tipo natural).
- La figura 7 muestra mediciones similares, pero usando títulos de anticuerpos neutralizantes séricos.
- 25 La figura 8 muestra que los virus reagrupados H5N1 *ca* protegen a ratones de la exposición letal con 50, 500 ó 5.000 DL₅₀ del virus H5N1 de tipo natural. La figura 9 muestra la eficacia de protección frente a la replicación pulmonar de virus de exposición H5N1 homólogos y heterólogos en ratones. Tal como puede observarse, los virus reagrupados *ca* se replicaron peor que los virus de tipo natural. La figura 10 muestra datos relacionados usando aparatos respiratorios superiores de ratones. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con exposiciones de homólogos y heterólogos (por ejemplo, someter a prueba si la vacuna del 2003 protege frente a una exposición del 2003 de tipo natural (homólogo) o si una vacuna del 2003 protege frente a una exposición del 1997 de tipo natural (heterólogo), etc.).
- 30 La figura 11 muestra la eficacia de protección conferida por la vacuna H5N1 *ca* 2004 frente a la exposición a alta dosis (10⁵DICT₅₀) con virus H5N1 de tipo natural homólogos o heterólogos en ratones. La figura 12 muestra la eficacia de protección conferida por las vacunas H5N1 *ca* 1997 y 2003 frente a la exposición a alta dosis (10⁵DICT₅₀) con virus de tipo natural H5N1 homólogos o heterólogos en ratones. La figura 13 muestra la eficacia de protección conferida por la vacuna H5N1 *ca* 2004 frente a dosis bajas o altas de exposición a virus de tipo natural H5N1 homólogos en ratones. Las figuras 11-13 demuestran que las vacunas sometidas a prueba podrían proteger frente a otros virus relacionados.
- 35 El ejemplo actual demuestra varios puntos relativos a vacunas/virus reagrupados H5N1 *ca* a modo de ejemplo de la invención. Se demostró que los virus reagrupados *ca* 97, 03 y 04 tienen fenotipo *ts in vitro*, pérdida de patogenicidad en pollos y atenuación en ratones. Se espera que la atenuación también esté presente en hurones. También se demostró la eficacia de protección y protección cruzada frente a la exposición letal y la propagación sistémica con virus de tipo natural en ratones. También se espera eficacia de protección y protecciones cruzadas frente a la replicación de virus de exposición de tipo natural en el aparato respiratorio de ratones.
- 40 Se contempla usar estos virus/vacunas (y similares) para determinar si la inmunogenicidad y la eficacia mejoran tras 2 dosis de vacuna; para evaluar la inmunogenicidad en primates no humanos; para evaluar la atenuación y la eficacia de la vacuna en hurones; para determinar la contribución de la inmunidad humoral y celular a la eficacia observada de las vacunas producidas en ratones; para determinar qué residuos de la HA 2003 contribuyen a la inmunogenicidad potenciada e introducirlos en las HA 1997 y 2004; y para determinar los efectos de delecionar el sitio de escisión de aminoácidos multibásico y de la constelación de genes.

SECUENCIAS

A/Vietnam/1203/04

- 50 Secuencia de nucleótidos de A/Vietnam/1203/04 H5 (SEQ ID NO:1)

Longitud de molécula completa: 1767 nt

```

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

```

Secuencia de aminoácidos de A/Vietnam/1203/04 H5 (SEQ ID NO: 11)

Longitud de molécula completa: 564 aa

```

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

151 cpyqgkssff rnvwlikkn styptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
201 aeqtglyqnp ttyisvgtst lnqrlvpria trskvngqsg rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsti mkseleygnc ntckcqpnga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrnspqre trglfgaiag
351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eggsgyaadk estqkaidgv tnkvnsiidk
401 mntqfeavgr efnlerrie nlnkkmedgf ldvwtynaen lvlmenertl
451 dfhdsvknk ydkvrlqlrd nakelngcf efyhkcdnec mesvrngtyd
501 ypyyseearl kreeisgvkl esigiyqils iystvassla laimvaglsl
5 551 wmcnsgslqc rici

```

Secuencia de nucleótidos de A/Vietnam/1203/04 N1 (SEQ ID NO: 2)

Longitud de molécula completa: 1398 nt

```

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

Secuencia de aminoácidos de A/Vietnam/1203/04 N1 (SEQ ID NO: 12)

Longitud de molécula completa: 449 aa

```

1 mnpnqkiiti gsicmvtgiv slmlqignmi siwvshsiht gnqhqsepis
51 ntnfltekav asvklagnss lcpingwavy skdnsirigs kgdvvfirep
101 fiscshlecr tffltqgall ndkhsngtvk drsphrtlms cpvgeapspy
5 151 nsrfesvaws asachdgtsw ltigisgpdn gavavlk yng iitdtikswr

201 nnilrtqese cacvngscft vmtdgpsngq ashkifmek gkvksveld
251 apnyhyeecs cypnageitc vcrdnwhgsn rpwvsfnqnl eyqigyicsg
301 vfgdnprpnd gtgscgpvss ngaygvkgfs fkyngvwig rtkstnsrsg
351 femiwdpngw tetdssfsvk qdivaitdws gysgsfvqhp eltglcdirp
401 cfwvelirgr pkestiwtsq ssisfcgvns dtvgwswpdg aelpftidk
    
```

A/Hong Kong/213/03

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/213/03 H5 (SEQ ID NO: 3)

Longitud de molécula completa: 1767 nt

```

1 agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt
51 ttgcaatagt cagtcttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat
101 gcaacaact cgacagagca ggttgacaca ataatggaaa agaacggtac
151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac ggaagctct
201 gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg tagtgtagct
251 ggatggctcc tcggaaacce aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga
301 atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agccaatgac ctctgttacc
351 caggggattt caacgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata
401 aaccatthttg agaaaattca gatcatcccc aaaaattctt ggtccagtca
451 tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg tccataccaa ggaaagtcct
501 cctthttcag gaatgtggtg tggcttatca aaaagaacaa tgcataccca
551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggattt
601 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagact aggtctctac
651 aaaacccaac cacctacatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga
701 ttggtaccaa aaatagctac tagatccaaa gtaaacgggc aaaatggaag
751 gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc gaatgatgca atcaacttcg
801 agagcaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag
851 aaaggggact cagcaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa
901 caccaagtgt caaactccaa tgggggcatg aaactctagt atgccattcc
951 acaatataca ccctctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca
1001 aacagattag tccttgcgac tgggctcaga aatagccctc aaagagagac
1051 tcgaggatta tttggagcta tagcaggttt tatagaggga ggatggcagg
1101 gaatggtaga tggttggtat gggtagacc atagcaatga gcaggggagt
1151 gggtagcctg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac
1201 caataaggte aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg
1251 ttggaaggga atttaataac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag
1301 aagatggaag acggattcct agatgtctgg acttataatg ctgaacttct
1351 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaagtca
1401 agaacttta cgacaaggte cgactacagc ttagggataa tgcaaaggag
1451 ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcac aaatgtgata atgaatgtat
1501 ggaaagtgta agaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag
1551 caagactaaa aagagaggaa ataagtggag taaaattgga gtcaatagga
1601 acttaccaaa tactgtcaat ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact
1651 ggcaatcatg gtagctggte tatctttatg gatgtgctcc aatgggtcgt
1701 tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt gtagttaaaa
1751 acacccttgt ttctact

```

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/213/03 H5 (SEQ ID NO: 13)

Longitud de molécula completa: 564 aa

```

1 mektivllfai vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
51 kthngklcdl dgvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekan
101 pandlcypgd fndyeelkhl lsrinhfeki qiipknsyss heaslgvssa
151 cpyqgkssff rnvwlikkn nayptikrsy nntngedllv lwgihhpnda
201 aeqrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvpkia trskvngqng rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgsai mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrnspqre trglfgaiag
351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eggsgyaadk estqkaidgv tnkvnsiidk
401 mntqfeavgr efnlerrie nlnkkmedgf ldvwtyna elvlmenertl
451 dfhdsvknl ydkvrlqlrd nakelngngcf efyhkcdnec mesvrngtyd
501 ypyseearl kreeisgvkl esigtyqils iystvassla laimvaglsl
551 wmcsnsgslqc rici

```

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/213/03 N1 (SEQ ID NO: 4)

Longitud de molécula completa: 1458 nt

```

1 agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aacaaccatt
51 ggatcaatct gtatggtaat tggaatagtt agcttgatgt tacaattgg
101 gaacataatc tcaatatggg ttagtcattc aattcaaaca gggaatcaac
151 accaggctga accatgcaat caaagcatta ttacttatga aaacaacacc
201 tgggtaaacc agacatatgt caacatcagc aataccaatt ttcttactga
251 gaaagctgtg gcttcagtaa cattagcggg caattcatct ctttgcccca
301 ttagtggatg ggctgtatac agtaaggaca acggtataag aatcggttcc
351 aaggggatg tgtttgttat aagagagccg ttcattcat gctcccactt
401 ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc
451 attctaattg gaccgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt
501 tgtcccgtgg gtgaggctcc ttccccatac aactcgaggt ttgagtctgt
551 tgcttggtcg gcaagtgctt gtcattgatg cactagttgg ttgacaattg
601 gaatttctgg cccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc
651 ataataacag acactatcaa gagttggagg aacaacataa tgagaactca
701 agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact gttatgactg
751 atggaccaag taatgggcag gcttcataca aatcttcag aatagaaaaa
801 gggaaagtag ttaaatacag cgaattaat gcccttaatt atcactatga
851 ggagtgtctc tgttatctg atgctggaga aatcacatgt gtgtgcaggg
901 ataactggca tggctcaaat cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg
951 gagtatcgaa taggatatat atgcagtgga gttttcggag acaatccacg
1001 cccaatgat gggacaggca gttgtggtcc ggtgtcccct aaaggggcat
1051 atggaataaa agggttctca tttaaatac gcaatggtgt ttggatcggg
1101 agaaccataa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc
1151 aatggatgg actggtacgg acagtaattt ttcagtaaa caagatattg
1201 tagctataac cgattggtca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca
1251 gaactgacag gattagattg cataagacct tgtttctggg ttgagctaat
1301 cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagttgg agcagcatat
1351 cttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggg
1401 gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa aaactccttg
1451 tttctact

```

5 Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/213/03 N1 (SEQ ID NO: 14)

Longitud de molécula completa: 469 aa

```
1 mnpnqkitti gsicmvigiv slmlqignii siwvshsiqt gnqhqaepcn
· 51 qsiityennt wvnqtyvnis ntnfltekav asvtlagNSS lcpisgwavy
101 skdngirigs kgdvvfirep fiscshlecr tffltqgall ndkhsngtvk
151 drsphrtlms cpvgeapsy nsrfesvaws asachdgtsw ltigisgpdn
201 gavavlkyng iitdtikswr nnimrtqese cacvngscft vmtdgpsngq
251 asykifriek gkvksaeln apnyhyeecs cypdageitc vcrdnwhgsn
301 rpwvsfnqnl eyrigyicsg vfgdnprpnd gtgscgpvsp kgaygikgfs
351 fkygngvwig rtkstnsrsg femiwdpngw tgtdsnfsvk qdivaitdws
401 gysgsfvqhp eltglcdirp cfwvelirgr pkestiwtsg ssisfcgvns
451 dtvgwswpdg aelpftidk
```

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

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/491/97 H5 (SEQ ID NO: 5)

5 Longitud de molécula completa: 1767 nt

```

1 agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc
51 ttgcaacagt cagccttggt aaaagtgacc agatttgcac tggttaccat
101 gcaaacaact cgacagagca agttgacaca ataatggaaa agaatgttac
151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaag gacacacaac ggaagctct
201 gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg tagtgtagct
251 ggatggctcc tcggaaacct tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga
301 atggtcttac atagtggaga aggccagtcc agccaatgac ctctgttatc
351 caggaattt caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata
401 aaccattttg agaaaattca gataatcccc aaaagttctt ggtccaatca
451 tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg tccatacctt gggaggctct
501 cctttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag tagctacca
551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggact
601 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggctctatc
651 aaaacccaac cacctacatt tccgttgga catcaacact gaaccagaga
701 ttggttccag aaatagctac tagacccaaa gtaaaccggc aaagtggaag
751 aatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc gaatgatgcc atcaatttcg
801 agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag
851 aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa
901 caccaagtgt caaactccaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc
951 acaacataca cccctcacc atcggggaat gccccaata tgtgaaatca
1001 aacagattag tccttgcaac tggactcaga aataccctc aacgagagac
1051 gcgaggacta tttggagcta tagcaggttt tatagagga ggatggcagg
1101 gaatggtaga tgggtggtat gggtagacc atagcaatga gcaggggagt
1151 ggatacgctg cagaccaaga atccacacaa aaggcaatag atggagtcac
1201 caataaggtc aactcgatca ttaacaaaat gaacactcag tttgaggccg
1251 ttggaagga atttaataac ttggaagga ggatagagaa ttaaacaaag
1301 aaaatggaag acggattcct agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct
1351 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaatgtca
1401 agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa tgcaaggag
1451 ctgggtaatg gttgtttcga attctatcac aaatgtgata acgaatgtat
1501 ggaaagtgta aaaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag
1551 caagactaaa cagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatggga
1601 acttaccaa tactgtcaat ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact

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

```

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/491/97 H5 (SEQ ID NO: 15)

Longitud de molécula completa: 564 aa

```

1 mekiivlllat vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
51 rthngklcdl ngvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekas
101 pandlcypgn fndyeelkhl lsrinhfeki qiipksswsn hdassgvssa
151 cpylgrssff rnvvwlikn ssyptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
201 aeqtrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvpeia trpkvngqsg rmeffwtilk
251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsti mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrntpqre trglfgaiag
351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eggsgyaadq estqkaidgv tnkvnsiink
401 mntqfeavgr efnlerrie nlnkkmedgf ldvwtyna el lvlmenertl
451 dfhdsnvknl ydkvrlqlrd nakelngpcf efyhkcdnec mesvknngtyd
501 ypgyseearl nreeisgvkl esmgtyqils iystvassla laimvaglsl
551 wmcsnngslqc rici

```

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID NO: 6)

Longitud de molécula completa: 1401 nt

```

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

```

5 Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID NO: 16)

Longitud de molécula completa: 450 aa

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

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

Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/491/97 (Ser211) H5 (SEQ ID NO: 7)

Longitud de molécula completa: 1767 nt

1 agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc
 51 ttgcaacagt cagccttggt aaaagtgacc agatttgcat tggttaccat
 101 gcaaacact cgacagagca agttgacaca ataatggaaa agaattgttac
 151 tgttacacat gcccaagaca tactggaaag gacacacaac gggaaagctct
 201 gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg tagtgtagct
 251 ggatggctcc tcggaaaccc tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga
 301 atggtcttac atagtggaga aggccagtcc agccaatgac ctctgttatc
 351 caggaattt caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata
 401 aaccattttg agaaaattca gataatccc aaaagttctt ggtccaatca
 451 tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg tccatacctt gggaggtcct
 501 cttttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag tagctacca
 551 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttgggtact
 601 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggctctatc
 651 aaaacccaac cacctacatt tccgttggaa catcaacact gaaccagaga
 701 ttggtttcag aaatagctac tagacccaaa gtaaaccgggc aaagtggag
 751 aatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc gaatgatgcc atcaatttcg
 801 agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag
 851 aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa
 901 caccaagtgt caaactccaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc
 951 acaacataca cccctcacc atcggggaat gccccaaata tgtgaaatca
 1001 aacagattag tccttgcaac tggactcaga aatacccctc aacgagagac
 1051 gcgaggacta tttggagcta tagcaggttt tatagaggga ggatggcagg
 1101 gaatggtaga tggttgggat gggtagacc atagcaatga gcaggggagt
 1151 ggatacgtg cagaccaaga atccacacaa aaggcaatag atggagtcac
 1201 caataaggtc aactcgatca ttaacaaat gaacactcag tttgaggccg
 1251 ttggaaggga atttaataac ttggaaagga ggatagagaa tttaaacaag
 1301 aaaatggag acggattcct agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct

5

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

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/491/97 (Ser211) H5 (SEQ ID NO: 17)

Longitud de molécula completa: 564 aa

1 mektivlllat vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile
 51 rthngklcdl ngvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekas
 101 pandlcypgn fndyeelkhl lsrinhfeki qiipksswsn hdassgvssa
 151 cpylgrssff rnvvlikkn ssyptikrsy nntnqedllv lwgihhpnda
 201 aeqtrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvseia trpkvngqsg rmeffwtilk
 251 pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsti mkseleygnc ntckcqtmgga
 301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrllva tglrntpqre trglfgaiag
 351 fieggwqgmv dgwygyhhsn eqgsgyaadq estqkaidgv tnkvnsiink
 401 mntqfeavgr efnlerrie nlnkkmedgf ldvwtynael lvlmenertl
 451 dfhdsnvknl ydkvrlqlrd nakelngngcf efyhkcdnec mesvknngtyd
 501 ypqyseearl nreeisgvkl esmgtyqils iystvassla laimvaglsl
 551 wmcnngslqc rici

5 Secuencia de nucleótidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID NO: 8)

Longitud de molécula completa: 1401 nt

1 agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt
 51 ggatcaatct gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt tacaattgg
 101 aaacacaata tcagtatggg tcagccacat aattaaact tggcacccaa
 151 accagcctga accatgcaac caaagcatca atttttacac tgagcaggct
 201 gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc ctattagtgg
 251 atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggg tccaaagggg
 301 atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc
 351 agaacctttt tcttgacca aggagcccta ttgaatgaca agcattctaa
 401 tgggaccgtc aaagacagga gccctatag aactttaatg agctgtcctg
 451 ttgggtgaggc cccttcccca tacaactcaa ggtttgagtc tgttgcttgg
 501 tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacaa ttggaatttc
 551 cgggccggat aatggggctg tggctgtgtt gaaatacaat ggcataataa
 601 cagacaccat caagagtgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct
 651 gaatgtgcat gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc
 701 gagtaatgaa caggcctcat acaagatttt caagatagaa aaggggaggg
 751 tagtcaaate agttgagttg aacgcccta attatcatta cgaggaatgc
 801 tcctgttatc ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca gggataatg
 851 gcatggctcg aaccgaccat ggggtgtctt caatcagaat ctggagtatc
 901 aataggata tatatgcagt ggggttttcg gagacagtc acgccccaat
 951 gatgggacag gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt
 1001 aaaagggttt tcatttaaat acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca
 1051 aaagcactag ttccaggagc ggttttgaaa tgatttggga tccaaatggg
 1101 tggaccgaaa cagacagtag cttctcgttg aagcaagaca tcatagcgat
 1151 aactgattgg tcaggataca gcgggagttt tattcaacat ccagaactga
 1201 caggattaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaact aatcagaggg
 1251 aggcccaaag agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg
 1301 tgggtgtaaat agtgacactg tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt
 1351 tgccatacac cattgacaag tagtttgttc aaaaaactcc ttgtttctac
 1401 t

Secuencia de aminoácidos de A/Hong Kong/486/97 N1 (SEQ ID NO: 18)

Longitud de molécula completa: 450 aa

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

5

ca A/ck/Hong Kong/G9/97

Secuencia de nucleótidos de ca A/ck/Hong Kong/G9/97 (SEQ ID NO: 9)

Longitud de molécula completa: 1690 pb

1 ttaaccactc aagatggaag caataccact aataactata ctactagtag
 51 taacagcaag caatgcagac aaaatctgca tcggctacca atcaacaaac
 101 tccacagaaa ccgtagacac gctaacagaa aacaatgttc ctgtgacaca
 151 tgccaaagaa ttgctccaca cagagcacia tgggatgctg tgtgcaacaa
 201 atctgggacg tcctcttatt ctagacactt gcaccattga aggactgatc
 251 tatggcaacc cttcttgtga tctactgttg ggaggaagag aatggtccta
 301 catcgtcгаа agaccatcgg ctgttaatgg aatgtgttac cccgggaatg
 351 tagaaaacct agaggaacta aggtcatttt ttagttctgc tagttcctac
 401 caaagaatcc agatctttcc agacacaatc tggaatgtgt cttacagtgg
 451 aacaagcaaa gcatgttcag attcattcta caggagcatg agatgggtga
 501 ctcaaaagaa caacgcttac cctattcaag acgccaata cacaaataat
 551 agaggaaaga gcattctttt catgtggggc ataaatcacc cacctaccga
 601 tactgcacag acaaactctgt acacaaggac tgacacaaca acaagtgtgg
 651 caacagaaga tataaatagg accttcaaac cagtgatagg gccaaaggccc
 701 cttgtcaatg gtctgcaggg aagaattgat tattattggt cggattgaa
 751 accaggtcag acattgcgag taagatccaa tgggaatcta atcgctccat
 801 ggtatgggca cattctttca ggagagagcc acggaagaat cctgaagact
 851 gatttaaaca gtggtagctg tgtagtgcaa tgtcaaacag aaagaggtgg
 901 cttaaatact actttgccat tccacaatgt cagtaaatat gcatttgгаа
 951 actgcccгаа atatgttgga gtaaagagtc tcaaactggc agttgggtctg
 1001 aggaatgtgc ctgctagatc aagtagagga ctatttgggg ccatagctgg
 1051 attcatagag ggaggttggg cagggctggg cgctgggttg tatgggttcc
 1101 agcattcaaa tgatcaaggg gttgggtatag ctgcagatag agactcaact

 1151 caaagggcaa ttgacaaaat aacgtccaaa gtgaataata tagtcgataa
 1201 aatgaacaag caatatgaaa ttattgatca tgaattcagc gaggttgaaa
 1251 atagactcaa tatgatcaat aataagattg atgaccagat acaagacata
 1301 tgggcatata acgctgaatt gctagtgtg cttgaaaacc agaaaacact
 1351 cgatgagcat gatgcgaatg taacaatct atataacaaa gtgaagaggg
 1401 cactgggttc caatgcaatg gaagatggga aaggatgttt cgagctatac
 1451 cataaatgtg atgatcagtг catggagaca attcggaacg ggacctataa
 1501 caggaggaag tataaagagg aatcaagact agaaagacag aaaatagaag
 1551 gggтcaagct ggaatctгаа ggaacttaca aaatcctcac catttattcg
 1601 actgtcgct catctcttgt gattgcaatg gggtttgctg ccttcttgtt
 1651 ctgggccatg tccaatggat cttgcagatg caacatttga

Secuencia de aminoácidos de *ca A/ck/Hong Kong/G9/97 H9* (SEQ ID NO: 19)

Longitud de molécula completa: 558 aa

1 meaiplitil lvvtasnadk icigyqstns tetvdtlten nvpvthakel
 51 lhtehngmlc atnlgrplil dtctiegly gnpscdlllg grewsyiver
 101 psavngmryp gnvenleelr sffssassyq rigifpdtiw nvsysgtska
 151 csdsfyrsmr wltqknnayp iqdaqytnnr gksilfmwgi nhpptdtaqt
 201 nlytrtdttt svatedinrt fkpvigprpl vnglqgridy ywsvlkpgqt
 251 lrvrsgnli apwyghilsg eshgrilktl lnsqscvvc qtergglntt
 301 lpfhvnvskya fgncpkyvgv kslklavglr nvparssrgl fgaiagfieg
 351 gwsglvagwy gfhqsndqgv giaadrstq raidkitskv nnivdkmnkq
 401 yeiidhefse venrlmynn kiddqiqdiw aynaellvll enqktldehd
 451 anvnnlynkv kralgsname dgkgcfelyh kcddqcmeti rngtynrrky
 501 keesrlerqk iegvkleseg tykiltiyst vasslviamg faaflfwams
 551 ngscrcni

Secuencia de nucleótidos de *ca A/ck/Hong Kong/G9/97 N2* (SEQ ID NO: 10)

Longitud de molécula completa: 1428 pb

1 aatgaatcc aatcagaag ataatagcaa ttggctctgt ttctctaact
 51 attgcgacaa tatgcctcct catgcagatt gctatcttag caacgactat
 101 gacactacat ttcaagcaga atgaatgcat caactcctcg aataatcaag
 151 tagtgccatg tgaaccaatc ataatagaaa ggaacataac agagatagtg
 201 catttgaata gtactacctt agagaaggaa atttgtccta aagtagcaga
 251 ctacaggaat tgggtcaaac cacaatgtca aatcacaggg ttcgctcctt
 301 tctccaagga caattcaatt aggctctccg cagggtggaga tatttgggtg
 351 acaagagAAC cttatgtatc gtgCGgtctt ggtaaatgtt atcaatttgc
 401 acttgggcag ggaaccactt tggagaacaa aactcaaac ggcacagcac
 451 atgatagaac tcctcataga acccttttaa tgaatgagtt ggggtgttccg
 501 tttcatttgg caaccaaac agtgtgcata gcatgggtcca gctcaagctg
 551 ccatgatggg aaagcatggt tacatgtttg tgtcactggg gatgatagaa
 601 atgcaacggc tagcatcatt tatgatggga tacttgttga cagtattggt
 651 tcatggtcta aaaacatcct cagaactcag gagtcagaat gcggttgcac
 701 caatggaacc tgtgcagtag taatgactga tggaaagtga tcaggaaggg
 751 ctgacactag aatactattt attagagagg ggaaaattgc acacattagc
 801 ccattgtcag gaagtgtcga gcatgtggag gaatgctcct gttacccccg
 851 atatccagaa gttagatgtg tttgcagaga caattggaag ggatccaata
 901 ggcccgttct atatataaat atggcaaatt atagtattga ttccagttat
 951 gtgtgctcag gacttggttg cgacacacca agaatgatg ataggcttag
 1001 cagcagcaac tgcagagatc ctaataacga gagaggggccc ccaggagtaa
 1051 aagggtgggc ctttgacaat ggaaatgaca tttggatggg aagaacaatc
 1101 aaaaaggatt cgcgctcagg ttatgagact ttcagggtca ttggtggttg
 1151 gaccactgct aattccaagt cacagataaa tagacaagtc atagttgaca
 1201 gtgataactc gtctgggtat tctgggtatc tctctgttga aggcaaaagc
 1251 tgcacaca ggtgttttta cgtggagttg ataagaggaa gaccaaagga
 1301 gactagggtg tgggtggactt caaatagcat cattgtattt tgtggaactt
 1351 caggtagcta tggaacaggc tcatggcctg atggggcgaa tatcaatttc
 5 1401 atgcctatat aagctttcgc aattttag

Secuencia de aminoácidos de *ca A/ck/Hong Kong/G9/97 N2* (SEQ ID NO: 20)

Longitud de molécula completa: 469 aa

```

1  mnpnqkiiai gsvsltiati cllmqiaaila ttmtlhfkqn ecinssnnqv
51  vpcepiier niteivhlns ttlekeicpk vadyrnwskp qcqitgfapf
101 skdnsirlsa ggdiwvtrep yvscglgkcy qfalgggttl enkhsngtah
151 drtphrtllm nelgvpfhla tkqvciawss sschdgkawl hvcvtgddrn
201 atasiidygi lvdsigswsk nilrtqesec vcingtcavv mtdgsasgra
251 dtrilfireg kiahisplsg saqhveesc yprypevrcv crdnwkgsnr
301 pvlyinmany sidssyvcsg lvgdtprndd rssssncrdp nnergapgvk
351 gwafdngndi wmgrtikkds rsgyetfrvi ggwtansks qinrqvivid
401 dnssgygif svegkscinr cfyvelirgr pketrvwts nsiivfcgts
451 gtygtgswpd ganinfmpi

```

RESUMEN DE DESIGNACIONES DE SEQ ID NO

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

Lista de secuencias

- 5 <110> MedImmune Vaccines, Inc *et al.*
- <120> VARIANTES DE HEMAGLUTININA Y NEURAMINIDASA DE INFLUENZA
- 10 <130> FL260
- <150> 60/574.553
<151> 25-05-2004
- 15 <150> 60/657.554
<151> 28-02-2005
- <160> 20
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 1767
<212> ADN
<213> Virus influenza
- 25 <400> 1

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

- 5 <210> 2
- <211> 1398
- <212> ADN
- <213> Virus influenza
- <400> 2

ES 2 393 492 T3

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

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

5

<400> 3

agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt ttgcaatagt 60
 cagtcttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat gcaaacaact cgacagagca 120
 ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa 180
 gacacacaac gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg 240
 tagttagctt ggatggctcc tcggaaaccc aatgtgtgac gaattcatea atgtgccgga 300
 atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agccaatgac ctctgttacc caggggattt 360
 caacgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca 420
 gatcatccc aaaatttctt ggtccagtca tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg 480
 tccataccaa ggaaagtcct cctttttcag gaatgtggta tggcttatca aaaagaacaa 540
 tgcataccca acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggtatt 600
 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagact aggctctatc aaaaccaac 660
 cacctacatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa aaatagctac 720
 tagatccaaa gtaaacgggc aaaatggaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc 780
 gaatgatgca atcaacttcg agagcaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa 840
 aattgtcaag aaaggggact cagcaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa 900
 caccaagtgt caaactccaa tgggggcat aaactctagt atgccattcc acaatataca 960
 ccctctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcgac 1020
 tgggctcaga aatagccctc aaagagagac tcgaggatta tttggagcta tagcaggttt 1080
 tatagagga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggtagacc atagcaatga 1140
 gcaggggagt gggtagctg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac 1200
 caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaaggga 1260
 atttaataac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag aagatggaag acggattcct 1320
 agatgtctgg acttataatg ctgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga 1380
 ctttcatgac tcaaatgtca agaacttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa 1440
 tgcaaaggag ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcac aaatgtgata atgaatgat 1500
 ggaaagtga agaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag caagactaaa 1560
 aagagaggaa ataagtggag taaaattgga gtcaatagga acttaccaaa tactgtcaat 1620
 ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg 1680
 gatgtgctcc aatgggtcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt 1740
 gtagttaaaa acacccttgt ttctact 1760

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

5

<400> 4

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

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

5

<400> 5
 agcaaaagca ggggtataat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaacagt 60
 cagccttggt aaaagtgacc agatttgcatt tggttaccat gcaaacaact cgacagagca 120
 agttgacaca ataatggaaa agaattgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaag 180

gacacacaac gggagctct gcgatctaaa tggagtgaag cctctgattt tgagggattg 240
 tagttagtct ggatggctcc tcggaaaccc tatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga 300
 atggctttac atagtggaga aggccagtcc agccaatgac ctctgttatc caggggaattt 360
 caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca 420
 gataatcccc aaaagttctt ggtccaatca tgatgcctca tcaggggtga gctcagcatg 480
 tccatacctt gggaggtcct cctttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag 540
 tagctacca acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttgggtact 600
 gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggctctatc aaaacccaac 660
 cacctacatt tccgttggaa catcaacact gaaccagaga ttggttccag aaatagctac 720
 tagaccaaa gtaaacgggc aaagtggaag aatggagttc ttctggacaa ttttaagcc 780
 gaatgatgcc atcaatttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa 840
 aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa 900
 caccaagtgt caaactccaa tgggggcaat aaactctagt atgccattcc acaacataca 960
 ccccctcacc atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac 1020
 tggactcaga aatacccctc aacgagagac gcgaggacta tttggagcta tagcaggttt 1080
 tatagagggg ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat ggggtaccacc atagcaatga 1140
 gcaggggagt ggatacgctg cagaccaaga atccacacaa aaggcaatag atggagtcac 1200
 caataaggtc aactcgatca ttaacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaagggg 1260
 atttaataac ttggaagga ggatagagaa tttaaacaag aaaatggaag acggattcct 1320
 agatgtctgg acttacaatg ccgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga 1380
 ctttcatgac tcaaatgtca agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa 1440
 tgcaaaggag ctgggtaatg gttgtttcga attctatcac aaatgtgata acgaatgtat 1500
 ggaaagtgta aaaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag caagactaaa 1560
 cagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatggga acttacaaa tactgtcaat 1620
 ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatctttatg 1680
 gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt 1740
 gtagttaaaa acacccttgt ttctact 1767

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

5

<400> 6
 agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt ggatcaatct 60
 gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt taaaattgg aaacacaata tcagtatggg 120
 tcagccacat aattaaaact tggcacccaa accagcctga accatgcaac caagcatca 180
 atttttacac tgagcaggct gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc 240

ctattagtgg atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggt tccaaagggg 300
 atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc agaacctttt 360
 tcttgacca aggagcccta ttgaatgaca agcattctaa tgggaccgtc aaagacagga 420
 gccctatag aactttaatg agctgtcctg ttggtgaggc cccttcccca tacaactcaa 480
 ggtttgagtc tgttgcttgg tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacaa 540
 ttggaatttc cgggtccggat aatggggctg tggctgtggt gaaatacaat ggcataataa 600
 cagacacat caagagtgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct gaatgtgcat 660
 gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc gagtaatgaa caggcctcat 720
 acaagatttt caagatagaa aaggggaggg tagtcaaac agttgagttg aacgccccta 780
 attatcatta cgaggaatgc tcctgttatt ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca 840
 gggataattg gcatggctcg aaccgaccat ggggtgtcttt caatcagaat ctggagtatc 900
 aataggata tatatgcagt ggggttttctg gagacagtcc acgcccctaat gatgggacag 960
 gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt aaaagggttt tcatttaaatt 1020
 acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca aaagcactag ttccaggagc ggttttgaaa 1080
 tgatttggga tccaaatggg tggaccgaaa cagacagtag cttctcgttg aagcaagaca 1140
 tcatagcgat aactgattgg tcaggatata gcgggagttt tattcaacat ccagaactga 1200
 caggattaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaact aatcagaggg aggcccaaag 1260
 agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg tgggtgtaaatt agtgacactg 1320
 tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt tgccatacac cattgacaag tagtttgttc 1380
 aaaaaactcc ttgtttctac t 1401

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

5

<400> 7

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

5

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

<400> 8

agcaaaagca ggagtttaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt ggatcaatct 60
 gcatggtagt tgggataatc agcttgatgt tacaattgg aacacaata tcagtatggg 120
 tcagccacat aattaaact tggcacccaa accagcctga accatgcaac caaagcatca 180
 atttttacac tgagcaggct gcagcttcag tgacattagc gggcaattcc tctctctgcc 240
 ctattagtgg atgggctata tacagcaagg acaatagtat aagaattggg tccaaagggg 300
 atgtgtttgt tataagagaa ccattcatct catgctccca tttggaatgc agaacctttt 360
 tcttgacca aggagcceta ttgaatgaca agcattctaa tgggaccgtc aaagacagga 420
 gcccctatag aactttaatg agctgtcctg ttggtgaggc cccttcccca tacaactcaa 480
 ggtttgagtc tgttgcttgg tcagcaagtg cttgccatga tggcattagt tggctaacia 540
 ttggaatttc cgggccggat aatggggctg tggctgtgtt gaaatacaat ggcataataa 600
 cagacacat caagagtgg aggaacaaca cactgaggac gcaagagtct gaatgtgcat 660
 gtgtgaatgg ttcttgtttt actgtaatga cagatggacc gagtaatgaa caggcctcat 720
 acaagatttt caagatagaa aaggggaggg tagtcaaatc agttgagttg aacgccccta 780
 attatcatta cgaggaatgc tcctgttatt ctgatgctgg cgaaatcaca tgtgtgtgca 840
 gggataattg gcatggctcg aaccgacat ggggtgtctt caatcagaat ctggagtatc 900
 aataggata tatatgcagt ggggttttcg gagacagtcc acgcccctaat gatgggacag 960
 gcagttgtgg tccagtgtct cttaacggag cgtatggagt aaaagggttt tcatttaaat 1020
 acggcaatgg tgtttggatc gggagaacca aaagcactag tccaggagc ggttttgaaa 1080
 tgatttggga tccaaatggg tggaccgaaa cagacagtag cttctcgttg aagcaagaca 1140
 tcatagcgat aactgattgg tcaggataca gcgggagttt tattcaacat ccagaactga 1200
 caggattaaa ttgcatgaga ccttgcttct gggttgaact aatcagaggg aggcccaaag 1260
 agaaaacaat ctggactagt gggagcagta tatctttctg tgggtgtaaat agtgacactg 1320
 tgggttggtc ttggccagac ggtgctgagt tgccatacac cattgacaag tagtttgttc 1380
 aaaaaactcc ttgtttctac t 1401

5 <210> 9
 <211> 1690
 <212> ADN
 <213> Virus influenza
 <400> 9

ttaaccactc aagatggaag caataccact aataactata ctactagtag taacagcaag 60
 caatgcagac aaaatctgca tctggctacca atcaacaaac tccacagaaa ccgtagacac 120
 gctaacagaa aacaatgttc ctgtgacaca tgccaaagaa ttgctccaca cagagcacia 180
 tgggatgctg tgtgcaacia atctgggacg tcctcttatt ctagacactt gcaccattga 240
 aggactgatc tatggcaacc cttcttgtga tctactgttg ggaggaagag aatggctcta 300
 catcgtcgaa agaccatcgg ctgttaatgg aatgtgttac cccgggaatg tagaaaacct 360
 agaggaacta aggtcatttt ttagttctgc tagttcctac caaagaatcc agatctttcc 420
 agacacaatc tggaatgtgt cttacagtgg aacaagcaaa gcatgttcag attcattcta 480
 caggagcatg agatggttga ctcaaaagaa caacgcttac cctattcaag acgccaata 540
 cacaataat agaggaaaga gcattctttt catgtggggc ataaatcacc cacctaccga 600
 tactgcacag acaaatctgt acacaaggac tgacacaaca acaagtgtgg caacagaaga 660
 tataaatagg accttcaac cagtgatagg gccaaagccc cttgtcaatg gtctgcaggg 720
 aagaattgat tattattggt cggattgaa accaggctag acattgagag taagatccaa 780
 tgggaatcta atcgctccat ggtatgggca cttctttca ggagagagcc acggaagaat 840
 cctgaagact gatttaaaca gtggtagctg tgtagtcaa tgtcaaacag aaagaggtgg 900
 cttaaatact actttgcat tccacaatgt cagtaaatat gcatttggaa actgcccacia 960
 atatgttggg gtaaagagtc tcaaactggc agttggtctg aggaatgtgc ctgctagatc 1020
 aagtagagga ctatttgggg ccatagctgg attcatagag ggaggttggg cagggctggg 1080
 cgctggttgg tatgggttcc agcattcaaa tgatcaaggg gttggtatag ctgcagatag 1140
 agactcaact caaagggcaa ttgacaaaat aacgtccaaa gtgaataata tagtcgataa 1200
 aatgaacaag caatatgaaa ttattgatca tgaattcagc gaggttgaaa atagactcaa 1260
 tatgatcaat aataagattg atgaccagat acaagacata tgggcatata acgctgaatt 1320
 gctagtgctg cttgaaaacc agaaaacact cgatgagcat gatgcgaatg taaacaatct 1380
 atataacaaa gtgaagaggg cactgggttc caatgcaatg gaagatggga aaggatgttt 1440
 cgagctatac cataaatgtg atgatcagtg catggagaca attcggaacg ggacctataa 1500
 caggaggaag tataaagagg aatcaagact agaaagacag aaaatagaag gggccaagct 1560
 ggaatctgaa ggaacttaca aaatcctcac cttttattcg actgtcgcct catctcttgt 1620
 gattgcaatg gggtttgctg cttcttgtt ctgggccatg tccaatggat cttgcagatg 1680
 caacatttga 1690

5 <210> 10
 <211> 1428
 <212> ADN
 <213> Virus influenza
 <400> 10

aatgaatcc aatcagaag ataatagcaa ttggctctgt ttctctaact attgcgacaa 60
 tatgcctcct catgcagatt gctatcttag caacgactat gacactacat ttcaagcaga 120
 atgaatgcat caactcctcg aataatcaag tagtgccatg tgaaccaatc ataatagaaa 180
 ggaacataac agagatagtg catttgaata gtactacctt agagaaggaa atttgtccta 240
 aagtagcaga ctacaggaat tggcctcaaac cacaatgtca aatcacaggg ttcgctcctt 300
 tctccaagga caattcaatt aggctctccg caggtggaga tatttgggtg acaagagAAC 360
 cttatgtatc gtgcggtcct ggtaaagtgt atcaatttgc acttgggcag ggaaccactt 420
 tggagaacaa acaactcaaac ggcacagcac atgatagaac tcctcataga acccttttaa 480
 tgaatgagtt ggggtgttccg tttcatttgg caaccaaaca agtgtgcata gcatgggtcca 540
 gctcaagctg ccatgatggg aaagcatggt tacatgtttg tgtcactggg gatgatagaa 600
 atgcaacggc tagcatcatt tatgatggga tacttgttga cagtattggt tcatgggtcta 660
 aaaacatcct cagaactcag gagtcagaat gcgtttgcac caatggaacc tgtgcagtag 720
 taatgactga tggaaagtga tcaggaaggg ctgacactag aatactattt attagagagg 780
 ggaaaattgc acacattagc ccattgtcag gaagtgtcga gcatgtggag gaatgtcctt 840
 gttacccccg atatccagaa gttagatgtg tttgcagaga caattggaag ggatccaata 900
 ggcccgttct atatataaat atggcaaatt atagtattga ttccagttat gtgtgctcag 960
 gacttgttgg cgacacacca agaaatgatg ataggtctag cagcagcaac tgcagagatc 1020
 ctaataacga gagagggggc ccaggagtaa aagggtgggc ctttgacaat ggaaatgaca 1080
 tttggatggg aagaacaatc aaaaaggatt cgcgctcagg ttatgagact ttcagggtca 1140
 ttggtggtg gaccactgct aattccaagt cacagataaa tagacaagtc atagttgaca 1200
 gtgataactc gtctgggtat tctggtatct tctctgttga aggcaaaagc tgcatacaaca 1260
 ggtgttttta cgtggagtgtg ataagaggaa gaccaaagga gactaggggtg tgggtggactt 1320
 caaatagcat cattgtattt tgtggaactt caggtacctt tggaacaggc tcatggcctg 1380
 atggggcgaa tatcaatttc atgcctatat aagctttcgc aattttag 1428

- 5 <210> 11
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virus influenza

 <400> 11

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

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

5

<400> 12

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

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

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

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

Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser His Lys Ile Phe Lys Met Glu Lys
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
 340 345

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 13
<211> 564
<212> PRT
5 <213> Virus influenza

<400> 13

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

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

- <400> 14

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

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

450

455

460

Phe Thr Ile Asp Lys
465

5

<210> 15
<211> 564
<212> PRT
<213> Virus influenza

<400> 15

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

Leu Val Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Thr
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Glu Ser Thr Gln
 370 375 380

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

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn
 485 490 495

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

- <210> 16
- <211> 450
- 5 <212> PRT
- <213> Virus influenza

- <400> 16

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

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

Asp Lys
450

- 5 <210> 17
<211> 564
<212> PRT
<213> Virus influenza
- <400> 17

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

- <210> 18
- <211> 450
- 5 <212> PRT
- <213> Virus influenza

- <400> 18

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

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

450

- <210> 19
- <211> 558
- 5 <212> RRT
- <213> Virus influenza

- <400> 19

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

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

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

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

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

5 <210> 20
<211> 469
<212> PRT
<213> Virus influenza

<400> 20

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

Gly Ile Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Asn Ile Leu Arg
 210 215 220
 Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Ala Val Val
 225 230 235 240
 Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Arg Ala Asp Thr Arg Ile Leu Phe
 245 250 255
 Ile Arg Glu Gly Lys Ile Ala His Ile Ser Pro Leu Ser Gly Ser Ala
 260 265 270
 Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Glu Val Arg
 275 280 285
 Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Leu Tyr
 290 295 300
 Ile Asn Met Ala Asn Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Asn Asp Asp Arg Ser Ser Ser Ser Asn
 325 330 335
 Cys Arg Asp Pro Asn Asn Glu Arg Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly Trp
 340 345 350
 Ala Phe Asp Asn Gly Asn Asp Ile Trp Met Gly Arg Thr Ile Lys Lys
 355 360 365
 Asp Ser Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Arg Val Ile Gly Gly Trp Thr
 370 375 380
 Thr Ala Asn Ser Lys Ser Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Asn Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser
 405 410 415
 Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys
 420 425 430
 Glu Thr Arg Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Ile Val Phe Cys Gly
 435 440 445
 Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile
 450 455 460
 Asn Phe Met Pro Ile
 465

REIVINDICACIONES

1. Un virus influenza con reagrupamiento 6:2, en donde dicho virus comprende 6 regiones codificantes de genes que codifican para segmentos de genoma internos de A/Ann Arbor/6/60 y 2 regiones codificantes de genes que codifican para un polipéptido de hemaglutinina y un polipéptido de neuraminidasa, en el que el polipéptido de hemaglutinina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, el gen que codifica para el polipéptido de hemaglutinina comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 y el polipéptido de neuraminidasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.
2. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz del virus influenza reagrupado según la reivindicación 1.
3. Una vacuna contra influenza atenuada viva que comprende la composición según la reivindicación 2.
4. Una vacuna de virus dividido o virus inactivado que comprende la composición inmunogénica según la reivindicación 2.
5. Virus influenza reagrupado según la reivindicación 1 o composición inmunogénica según la reivindicación 2, para su uso en la estimulación del sistema inmunitario de un sujeto para producir una respuesta inmunitaria protectora contra el virus influenza, en donde el virus influenza reagrupado se administra al sujeto en una cantidad inmunológicamente eficaz y en un vehículo fisiológicamente eficaz.
6. Virus influenza reagrupado según la reivindicación 1 o composición inmunogénica según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento profiláctico de una infección viral en un sujeto, en donde el virus influenza reagrupado se administra al sujeto en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunogénica contra la infección viral.
7. Un método para producir virus influenza en cultivo celular, comprendiendo el método:
 - i) introducir en una población de células huésped, población de células huésped que puede soportar la replicación de virus influenza, una pluralidad de vectores que comprenden secuencias de ácido nucleico que corresponden a:
 - al menos 6 segmentos internos de genoma de la cepa de influenza A/Ann Arbor/6/60;
 - y al menos 2 regiones codificantes de genes que codifican para un polipéptido de hemaglutinina y un polipéptido de neuraminidasa,
 - en el que el polipéptido de hemaglutinina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, el gen que codifica para el polipéptido de hemaglutinina comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 y el polipéptido de neuraminidasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16;
 - ii) cultivar la población de células huésped en presencia de tripsina a una temperatura inferior o igual a 35°C; y,
 - iii) recuperar una pluralidad de virus influenza.

Figura 1

HA de tipo natural de VN/1203/2004

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

HA modificada

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

↓ Sitio de escisión en dominios HA1 y HA2.

Los residuos que se mutagenizaron están subrayados

Figura 2
Aislamiento de virus de hisopos

Virus	Mortalidad (muertos/total)	Orofaringeos		Cloacales		Anticuerpos detectados/ total
		N.º de extracciones/ total	Título de log ₁₀ medio (DIE ₅₀)	N.º de extracciones/ total	Título de log ₁₀ medio (DIE ₅₀)	
H5N1 wt 1997, 2003 y 2004	8/8	8/8	>6,3	8/8	>4,5	NA
H5N1 ca 1997, 2003 y 2004	0/8	0/8	<0,9	0/8	<0,9	0/8

Se inocularon pollos por vía intranasal con 10⁶ TCID₅₀ de virus.

Figura 3

	DL ₅₀ en ratones
A/AA/6/60 ca	>10⁷ DICT₅₀
A/HK/491/97	10² DICT₅₀
1997 H5N1/AA ca	>10⁷ DICT₅₀
A/HK/213/2003	10⁶ DICT₅₀
2003 H5N1/AA ca	>10⁷ DICT₅₀
A/Vietnam/1203/2004	10^{0,4} DICT₅₀
2004 H5N1/AA ca	>10⁷ DICT₅₀

Figura 4

Tejido	Virus	Veces promedio de diferencia en título a lo largo de 3 días
PULMONES	A/AA/6/60	93
	1997 H5N1	501
	2003 H5N1	12
	2004 H5N1	430
CORNETES NASALES	A/AA/6/60	32
	1997 H5N1	185
	2003 H5N1	ninguna
	2004 H5N1	100

Se administró por vía intranasal 10^6 DICT₅₀ de virus y se recogieron los tejidos en los días 2, 3 ó 4 tras la infección. Los títulos de virus se expresan como log₁₀ DICT₅₀ /g de tejido.

Figura 5
Títulos de virus en pulmones

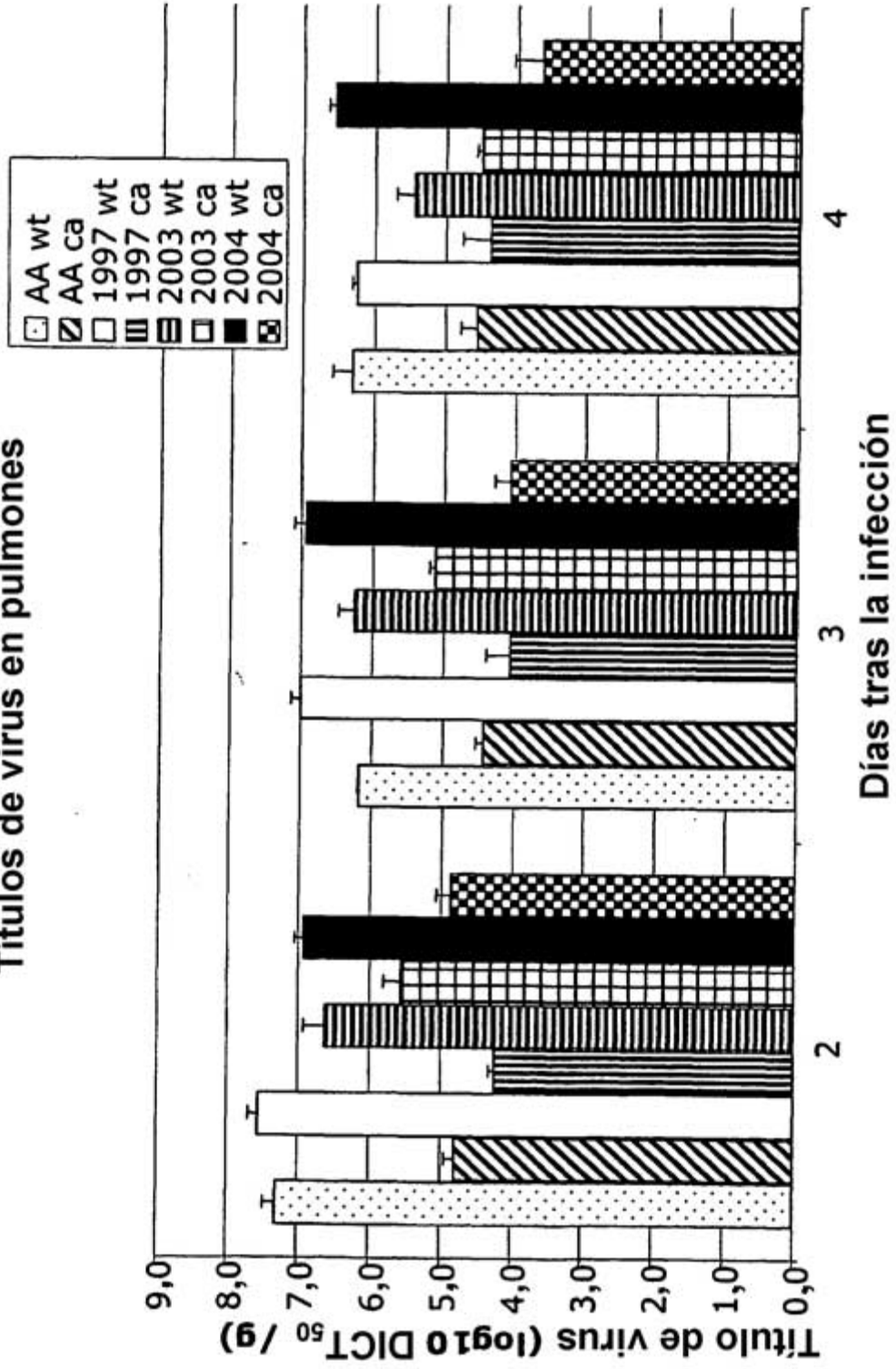


Figura 6

Virus de inmunización	Media geométrica de títulos de Ac HAI séricos contra los virus indicados		
	1997 wt	2003 wt	2004 wt
2003 ca	20	213,6	20
2003 wt	20	394	20

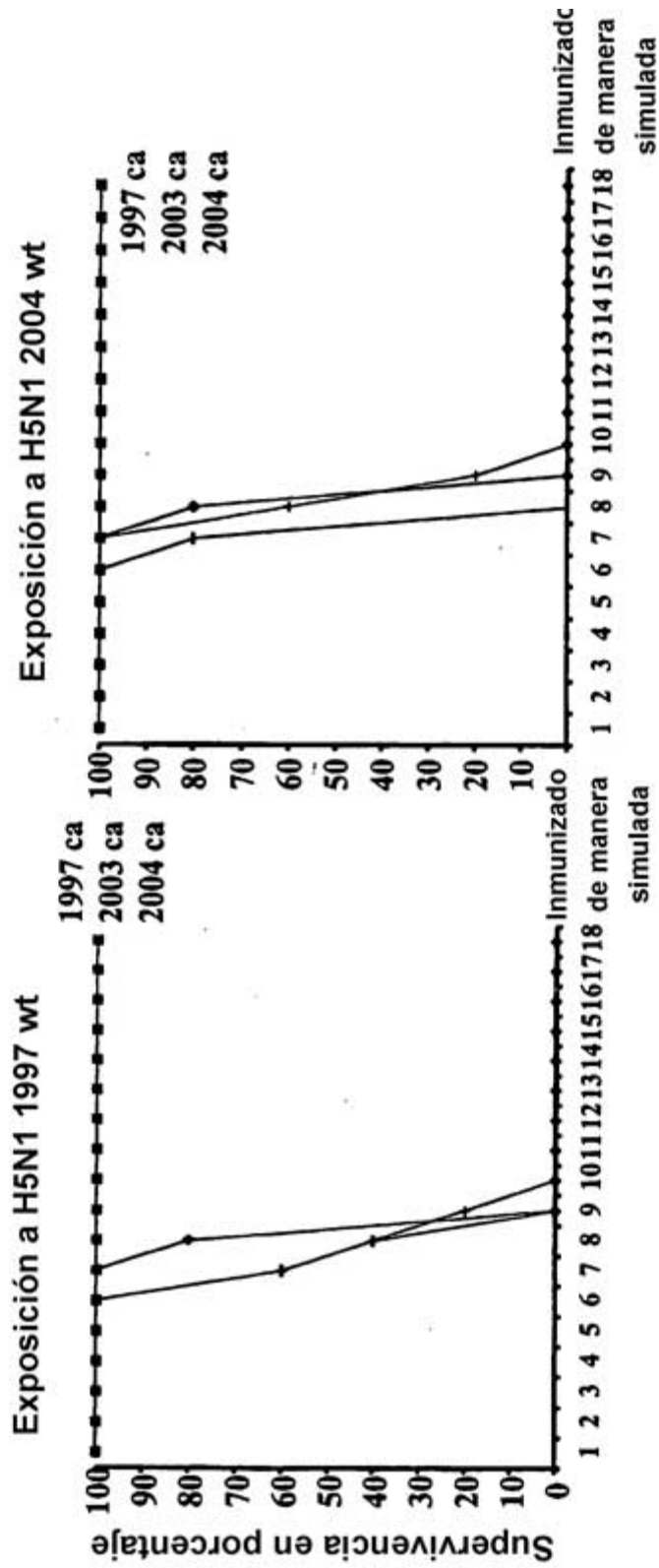
A un título indetectable se le asigna un valor de 20

Figura 7

Virus de inmunización	Media geométrica de títulos de Ac neutralizantes séricos contra los virus indicados		
	1997 wt	2003 wt	2004 wt
2003 ca	10	59,2	10
2003 wt	10	93,3	10

A un título indetectable se le asigna un valor de 10

Figura 8



Días tras la administración del virus de exposición

Figura 9

Reducción media en el título en pulmones tras					
Inmunización	Exposición ^a		Exposición a H5N1 heterólogos		
	homólogos	1997 wt	2003 wt	2004 wt	
1997 ca	2,5	NA	3,0		0,7
2003 ca	>5,8	2,3	NA		2,9
2004 ca	2,0	1,4	>5,7		NA

Figura 10

Reducción media en el título en CN tras				
Inmunización	Exposición a homólogos	Exposición a H5N1 heterólogos		
		1997 wt	2003 wt	2004 wt
1997 ca	4,3	NA	>1,2	2,6
2003 ca	>1,2	3,7	NA	>3,3
2004 ca	1,6	4,2	>3,5	NA

Figura 11

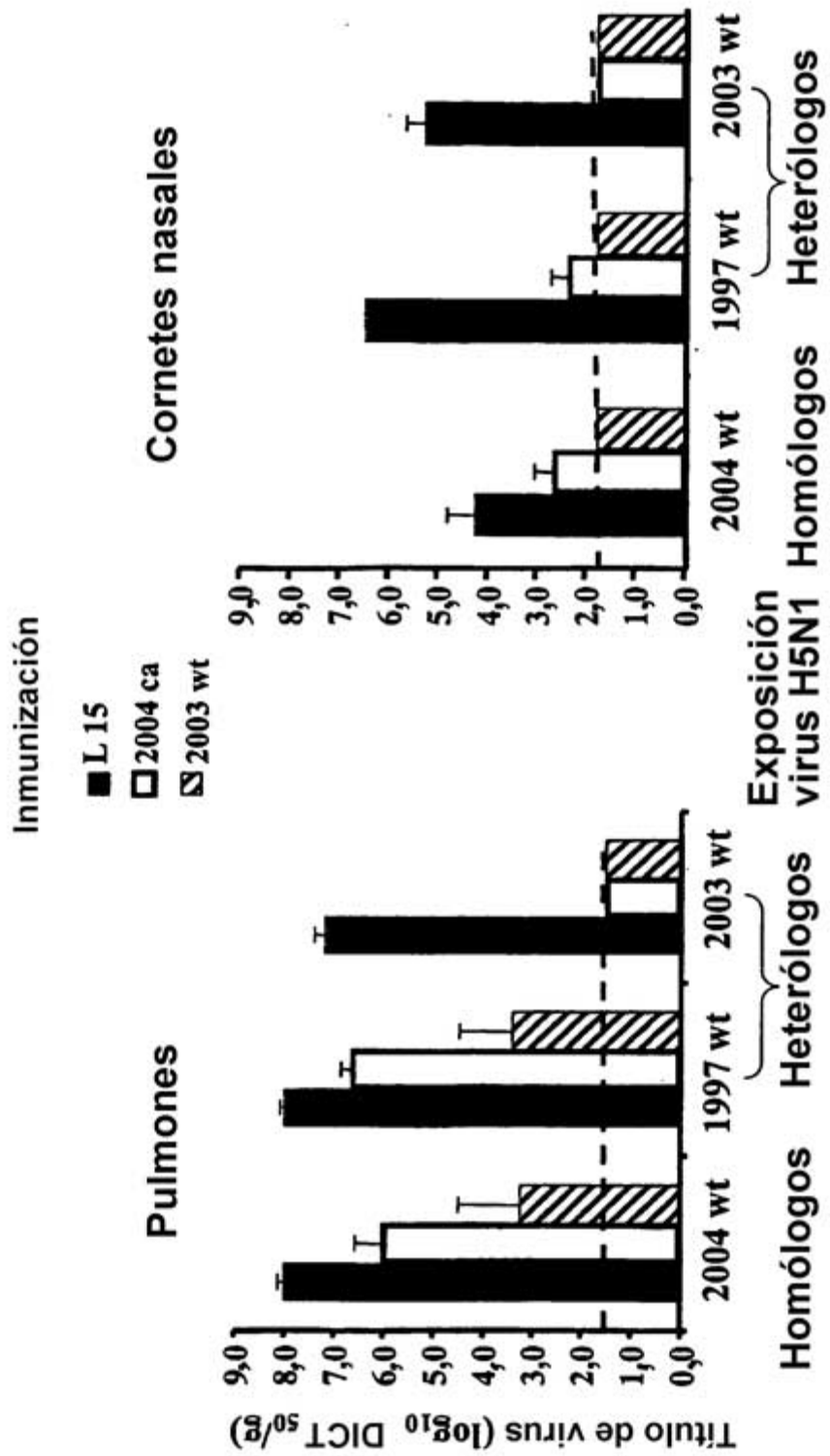


Figura 12

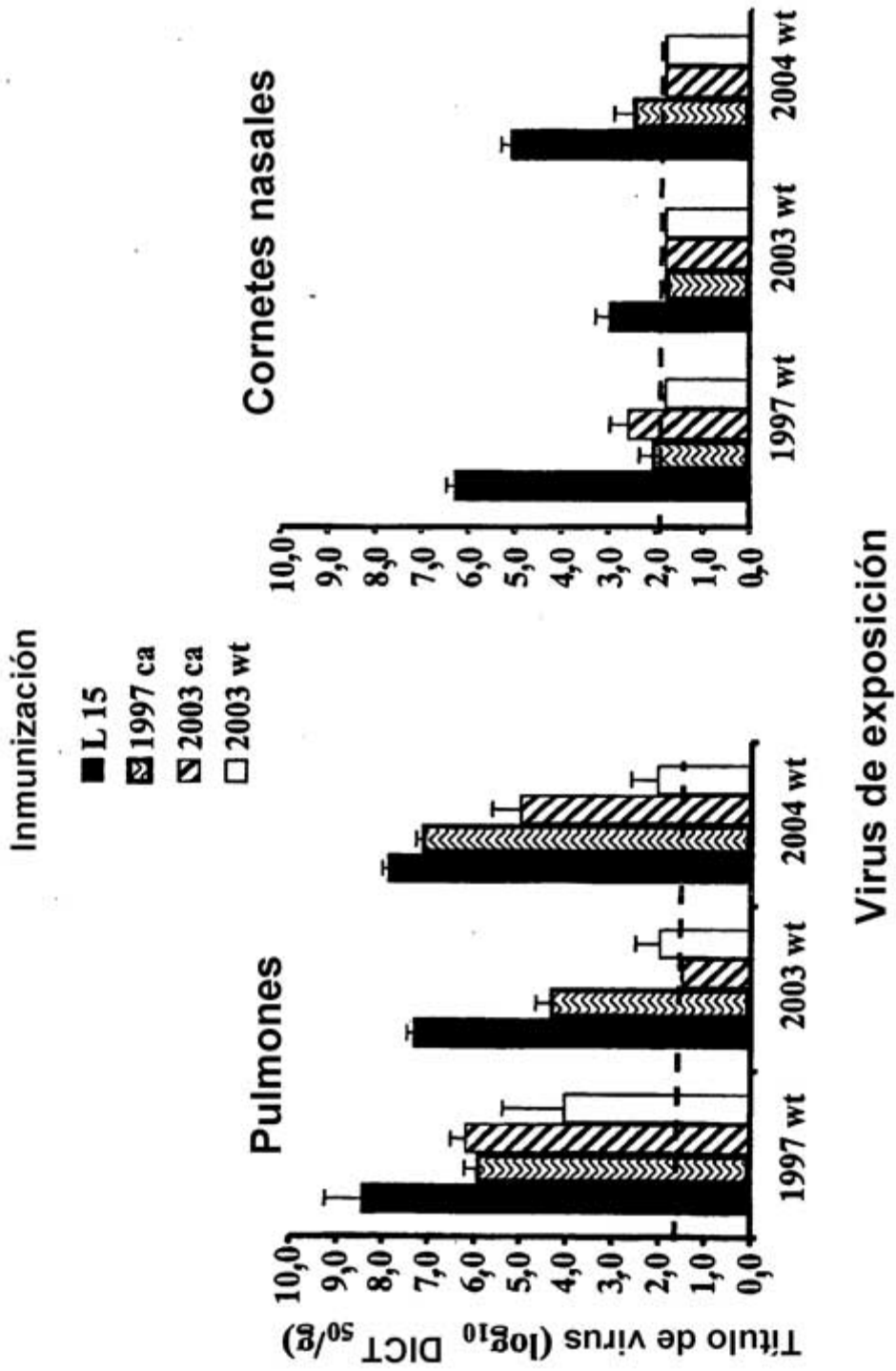


Figura 13

