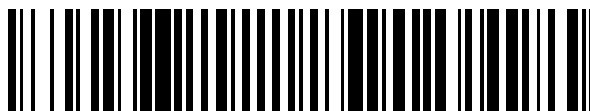


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 061**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

**C12N 15/74** (2006.01)

**C07K 14/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2006 E 06846105 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1945778**

54 Título: **Método de aumento de la replicación del virus influenza**

30 Prioridad:

**17.10.2005 US 726660 P**

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

**26.04.2013**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)  
ONE MEDIMMUNE WAY  
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**LU, BIN y  
HONG, JIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 402 061 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

Método de aumento de la replicación del virus influenza

**Antecedentes de la invención**

5 Los virus influenza están constituidos por un núcleo de ribonucleoproteína interno que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envuelta de lipoproteína externa revestida por una proteína de matriz. Los virus influenza A y B contienen cada uno ocho segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa. El genoma de influenza A codifica para al menos once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican para los tres polipéptidos que constituyen la ARN polimerasa dependiente de ARN viral. El segmento 1 codifica para la proteína del complejo de polimerasa PB2. Las proteínas de polimerasa restantes PB1 y PA están codificadas por el segmento 2 y el  
10 segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de influenza A codifica para una pequeña proteína, 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 a la célula y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica para el polipéptido de nucleoproteína (NP) de la nucleocápsida, 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 cortado y empalmado de manera alternativa. El segmento 8 codifica para NS1 y NS2 (NEP), dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes de ARNm cortados y empalmados de manera alternativa.

20 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 bistrónico. 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 cortado y empalmado.

25 Se han producido vacunas que pueden producir una respuesta inmunitaria protectora específica para virus influenza durante más de 50 años. Las vacunas pueden caracterizarse como vacunas de virus completos, vacunas de virus divididos, vacunas de antígenos de superficie y vacunas de virus atenuados vivos. Aunque formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacunas pueden producir una respuesta inmunitaria sistémica, las vacunas de virus atenuados vivos también pueden estimular la inmunidad mucosa local en las vías respiratorias.

30 FluMist™ es una vacuna atenuada, viva 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 segmentos génicos de HA y NA derivados de las cepas de tipo natural actualmente circulantes junto con seis segmentos génicos, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, de un virus donador maestro (VDM) común. El VDM para las cepas de influenza A de FluMist (VDM-A) se creó mediante pase en serie de la cepa A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) wt (tipo natural, ("wild type")) en cultivo de tejido 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). VDM-A se replica eficazmente a 25°C (ca, adaptado al frío ("cold adapted")), pero su crecimiento se restringe a 38 y 39°C (ts, sensible a la temperatura ("temperature sensitive")). Adicionalmente, este virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (att, atenuación ("attenuation")). 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 de las vías respiratorias. La estabilidad de esta propiedad se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos. En  
40 45 contraposición al fenotipo ts de cepas de influenza creadas por mutagénesis química, la propiedad ts de VDM-A no revirtió tras el pase a través de hámsteres infectados o en aislados propagados de niños (para una revisión reciente, véase Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines *Viral Immunol* 15:295-323).

50 Estudios clínicos en más de 20.000 adultos y niños que implicaban 12 cepas reordenantes 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 reordenantes que portan los seis genes internos de VDM-A y los dos segmentos génicos de HA y NA del virus wt (reordenante 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).

Hasta la fecha, todas las vacunas de influenza disponibles comercialmente en los Estados Unidos se han propagado

en huevos de gallina embrionados. Aunque el virus influenza crece bien en huevos de gallina, la producción de vacuna depende de la disponibilidad de huevos. Los suministros de huevos deben estar organizados, y las cepas para la producción de vacunas seleccionarse meses de antemano de la siguiente temporada de gripe, limitando la flexibilidad de este enfoque, y dando como resultado a menudo retrasos y escasez de producción y distribución. Desafortunadamente, algunas de cepas de vacunas de influenza, tales como la cepa A/Fujian/411/02 prototipo que circuló durante la temporada 2003-04, no se replican bien en huevos de pollo embrionados, y se han tenido que aislar mediante cultivo celular, un procedimiento costoso y que requiere mucho tiempo. La presente invención proporciona además una nueva tecnología para aumentar la capacidad de cepas de vacuna para replicarse en huevos de pollo embrionados. Además, la presente invención permite una producción más eficaz y económica de vacunas de influenza.

También se han desarrollado sistemas para producir virus influenza en cultivo celular en los últimos años (véase, por ejemplo, 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). Normalmente, estos métodos implican la infección de células huésped inmortalizadas adecuadas con una cepa de virus seleccionada. Aunque se eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patógenas de influenza crecen bien y pueden producirse según métodos de cultivo tisular establecidos. Además, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación al frío, adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas, no se han hecho crecer satisfactoriamente en cultivo tisular usando métodos establecidos.

La producción de virus influenza a partir de ADN recombinante aumentaría significativamente la flexibilidad y utilidad de métodos de cultivo tisular para la producción de vacunas de influenza. Recientemente, se han notificado sistemas para producir virus influenza A a partir de plásmidos recombinantes que incorporan ADNc que codifican para el genoma viral (véase, por ejemplo, Neumann *et al.* (1999) Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA 96:9345-9350; Fodor *et al.* (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J. Virol 73:9679-9682; Hoffmann *et al.* (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids, Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113; documento WO 01/83794). Estos sistemas ofrecen el potencial para producir virus recombinantes, y virus reordenantes que expresan las proteínas HA y NA inmunogénicas a partir de cualquier cepa seleccionada. Sin embargo, a diferencia del virus influenza A, no se ha publicado ningún informe que describa sistemas sólo con plásmidos para virus influenza B.

Adicionalmente, ninguno de los sistemas sólo con plásmidos disponibles actualmente es adecuado para generar cepas atenuadas, sensibles a la temperatura, adaptadas al frío adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas. La presente invención proporciona un sistema de ocho plásmidos para la generación de virus influenza B completamente a partir de ADNc clonado, y métodos para la producción de virus influenza A y B vivo atenuado adecuado para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacunas de virus vivos útiles para administración intranasal, así como otros numerosos beneficios que resultarán evidentes tras la revisión de la memoria descriptiva.

En más detalle, la invención se refiere a un método de aumento de la replicación de un virus influenza A reordenante en al menos el 10%, comprendiendo el método las etapas de: (a) introducir una sustitución de aminoácido en la secuencia de HA del virus reordenante, produciendo de ese modo un virus reordenante alterado, en el que la sustitución de aminoácido es treonina en la posición 196; y (b) hacer crecer el virus reordenante alterado en huevos.

### Sumario de la invención

La presente invención se define mediante la reivindicación. También se describe un sistema de múltiples vectores para la producción de virus influenza en cultivo celular, y a métodos para producir virus influenza recombinantes y reordenantes, incluyendo, por ejemplo, virus influenza atenuados (att), adaptados al frío (ca) y/o sensibles a la temperatura (ts), adecuados como vacunas, incluyendo vacunas de influenza atenuadas vivas, tales como las adecuadas para su administración en una formulación de vacuna intranasal.

En un primer aspecto, también se describen en el presente documento vectores y métodos para producir virus influenza B recombinante en cultivo celular, por ejemplo, en ausencia del virus auxiliar (es decir, un sistema de cultivo celular libre de virus auxiliar). Los métodos implican introducir una pluralidad de vectores, cada uno de los cuales incorpora una parte de un virus influenza B en una población de células huésped que pueden soportar replicación viral. Las células huésped se cultivan en condiciones permisivas para el crecimiento viral, y se recuperan virus influenza. Los virus influenza B pueden ser virus atenuados, virus adaptados al frío y/o virus sensibles a la temperatura. Por ejemplo, en una realización, los virus influenza B recombinantes derivados de vectores son virus atenuados, adaptados al frío, sensibles a la temperatura, de manera que son adecuados para su administración como vacuna atenuada viva, por ejemplo, en una formulación de vacuna intranasal. Los virus pueden producirse introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan todo o parte de un genoma de virus B/Ann Arbor/1/66 influenza, por ejemplo, un genoma de virus B/Ann Arbor/1/66 ca.

Por ejemplo, los virus influenza B pueden ser virus influenza modificados por ingeniería genética artificialmente que

incorporan una o más sustituciones de aminoácido que influyen en las propiedades biológicas características de la cepa de influenza B/Ann Arbor/1/66 ca. Tales virus influenza incluyen mutaciones que resultan de sustituciones de aminoácido en una o más de las posiciones PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup>, tal como: PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G). Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que individualmente o en combinación dé como resultado aumento de la sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío o atenuación en relación con virus de tipo natural es una mutación adecuada en el contexto descrito en el presente documento.

Pueden introducirse en una población de células huésped una pluralidad de vectores que incorporan al menos los 6 segmentos genómicos internos de una cepa de influenza B junto con uno o más segmentos genómicos que codifican para antígenos de superficie de influenza inmunogénicos de una cepa de influenza diferente. Por ejemplo, al menos los 6 segmentos genómicos internos ("la estructura principal") de una cepa de influenza B atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura seleccionada, por ejemplo, una cepa ca, att, ts de B/Ann Arbor/1/66 o una cepa de influenza B modificada por ingeniería genética artificialmente que incluye una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones especificadas anteriormente, se introducen en una población de células huésped junto con uno o más segmentos que codifican para antígenos inmunogénicos derivados de otra cepa de virus. Normalmente, los antígenos de superficie inmunogénicos incluyen cualquiera o ambos de los antígenos hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). Cuando se introduce un único segmento que codifica para un antígeno de superficie inmunogénico, los 7 segmentos complementarios del virus seleccionado se introducen también en las células huésped.

Pueden introducirse una pluralidad de vectores de plásmidos que incorporan segmentos genómicos del virus influenza B en una población de células huésped. Por ejemplo, se utilizan 8 plásmidos, cada uno de los cuales incorpora un segmento genómico diferente, para introducir un genoma de influenza B completo en las células huésped. Alternativamente, puede emplearse un mayor número de plásmidos, que incorporan subsecuencias genómicas más pequeñas.

Normalmente, los vectores de plásmido de la invención son vectores de expresión bidireccional. Un vector de expresión bidireccional de la invención incluye normalmente un primer promotor y un segundo promotor, estando los promotores primero y segundo operativamente unidos a hebras alternativas del mismo ADNc bicatenario que codifica para el ácido nucleico viral que incluye un segmento del genoma del virus influenza. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o una secuencia terminadora. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia terminadora pueden estar ubicadas flanqueando un segmento del genoma de virus influenza interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable en el contexto de la invención es la señal de poliadenilación de SV40. Un vector de plásmido a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.

Los vectores se introducen en células huésped que pueden soportar la replicación de virus influenza a partir de los promotores del vector. Los ejemplos favorables de células huésped incluyen células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T) y células COS. En combinación con los vectores de plásmido pAD3000 descritos en el presente documento, células Vero, células 293 y células COS son particularmente adecuadas. Cultivos conjuntos de una mezcla de al menos dos de estas líneas celulares, por ejemplo, una combinación de células COS y MDCK o una combinación de células 293T y MDCK, pueden constituir la población de células huésped.

Las células huésped que incluyen los vectores de influenza B se hacen crecer entonces en cultivo en condiciones permisivas para la replicación y el ensamblaje de los virus. Normalmente, las células huésped que incorporan los plásmidos de influenza B de la invención se cultivan a una temperatura inferior a 37°C, preferiblemente a una temperatura igual o inferior a 35°C. Normalmente, las células se cultivan a una temperatura entre 32°C y 35°C. En algunas realizaciones, las células se cultivan a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C. Tras el cultivo durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la replicación del virus hasta un alto título, se recuperan virus recombinantes y/o reordenantes. Opcionalmente, los virus recuperados pueden inactivarse.

También se describen en el presente documento métodos ampliamente aplicables de producción de virus influenza recombinantes en cultivo celular introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan un genoma de virus influenza en una población de células huésped que pueden soportar la replicación de virus influenza, cultivando las células a una temperatura inferior o igual a 35°C, y recuperando virus influenza.

Pueden introducirse una pluralidad de vectores de plásmido que incorporan segmentos genómicos de virus influenza en una población de células huésped. Pueden utilizarse 8 plásmidos, cada uno de los cuales incorpora un segmento genómico diferente, para introducir un genoma de influenza completo en las células huésped. Normalmente, los vectores de plásmido son vectores de expresión bidireccional. Un vector de plásmido a modo de ejemplo es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.

Los virus influenza pueden corresponder a un virus influenza B. Los virus influenza también pueden corresponder a un virus influenza A. Los métodos pueden incluir la recuperación de virus influenza recombinantes y/o reordenantes

que pueden provocar una respuesta inmunitaria tras su administración, por ejemplo, administración intranasal, a un sujeto. Los virus pueden inactivarse antes de su administración, o pueden administrarse virus atenuados vivos. También se describen en el presente documento virus influenza A e influenza B recombinantes y reordenantes producidos según los métodos descritos en el presente documento.

- 5 Los virus pueden incluir un virus influenza atenuado, un virus influenza adaptado al frío, un virus influenza sensible a la temperatura o un virus con cualquier combinación de estas propiedades deseables. El virus influenza puede incorporar un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de influenza, por ejemplo, una cepa adaptada al frío, sensible a la temperatura, atenuada de B/Ann Arbor/1/66. El virus influenza puede incorporar un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de influenza, por ejemplo, una cepa adaptada al frío, sensible a la temperatura, atenuada de A/Ann Arbor/6/60. Los virus pueden ser virus influenza modificados por ingeniería genética artificialmente que incorporan uno o más aminoácidos sustituidos que influyen en las características biológicas de, por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60 ca o B/Ann Arbor/1/66 ca. Tales aminoácidos sustituidos corresponden favorablemente a aminoácidos únicos de A/Ann Arbor/6/60 ca o B/Ann Arbor/1/66 ca, por ejemplo, en un virus de la cepa A: PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G); y, en un virus de la cepa B: PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V). De manera similar, se abarcan otras sustituciones de aminoácido en cualquiera de estas posiciones que dan como resultado sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación por los virus y métodos de la invención. Se entenderá que algunos virus A o B pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que los virus resultantes tendrán todas las sustituciones preferidas.
- 10
- 15
- 20 Opcionalmente, se producen virus reordenantes introduciendo vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa viral seleccionada por sus propiedades favorables en cuanto a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos genómicos que codifican para los antígenos de superficie (HA y NA) de una cepa seleccionada, por ejemplo, patógena. Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B patogénicamente relevante, tal como se realiza de manera rutinaria para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento NA puede seleccionarse de una cepa patógena emergente tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). Alternativamente, se introducen los siete segmentos génicos complementarios de la primera cepa en combinación con el segmento que codifica para o bien HA o bien NA. Los segmentos génicos internos pueden derivarse de la cepa B/Ann Arbor/1/66 o la cepa A/Ann Arbor/6/60 de influenza.
- 25
- 30 Adicionalmente, se describen en el presente documento métodos para producir virus influenza novedosos con propiedades deseables relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, virus influenza sensibles a la temperatura, atenuados y/o adaptados al frío, así como vacunas de influenza que incluyen tales virus influenza novedosos. Pueden producirse virus de la cepa A de influenza novedosos introduciendo mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácido en una o más posiciones especificadas que se demuestra en el presente documento que son importantes para el fenotipo sensible a la temperatura, por ejemplo, PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup>. Por ejemplo, se introducen mutaciones en las posiciones de nucleótido PB1<sup>1195</sup>, PB1<sup>1766</sup>, PB1<sup>2005</sup>, PB2<sup>821</sup> y NP<sup>146</sup>, u otras posiciones de nucleótido que dan como resultado una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido especificada. Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que individualmente o en combinación dé como resultado un aumento de sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío o atenuación en relación con virus de tipo natural es una mutación adecuada en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, se introducen favorablemente mutaciones seleccionadas de entre PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G) en el genoma de una cepa de influenza A de tipo natural, por ejemplo, PR8, para producir una variante sensible a la temperatura adecuada para su administración como vacuna atenuada viva. Para aumentar la estabilidad del fenotipo deseado, se introducen normalmente una pluralidad de mutaciones. Tras la introducción de la(s) mutación/mutaciones seleccionada(s) en el genoma de influenza, se replica el genoma de influenza mutado en condiciones en las que se produce virus. Por ejemplo, el genoma del virus influenza mutado puede replicarse en huevos de gallina. Alternativamente, el genoma del virus influenza puede replicarse en cultivo celular. En el último caso, el virus se amplifica además opcionalmente en huevos de gallina para aumentar el título. Virus sensibles a la temperatura y, opcionalmente, atenuados y/o adaptados al frío producidos según los métodos de la invención son también una característica de la invención, como lo son vacunas que incluyen tales virus. De manera similar, ácidos nucleicos virales recombinantes novedosos que incorporan una o más mutaciones en las posiciones PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup>, por ejemplo, mutaciones seleccionadas de entre PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PE1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G), y polipéptidos con tales sustituciones de aminoácido son una característica también descrita en el presente documento.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 Asimismo, los métodos presentados en el presente documento están adaptados para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y opcionalmente atenuado y/o adaptado al frío introduciendo una o más mutaciones especificadas en un genoma de influenza B. Por ejemplo, se introducen una o más mutaciones que dan como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup> en un genoma de la cepa de influenza B para producir un virus influenza B sensible a la temperatura. Las sustituciones de aminoácido a modo de ejemplo incluyen las siguientes: PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V). Tal como se indicó anteriormente, vacunas que incorporan tales virus así como ácidos nucleicos y polipéptidos que incorporan estas mutaciones y sustituciones de aminoácido son todos características de
- 60

la invención. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir las siguientes sustituciones de aminoácido: PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V). Se contempla específicamente que sustituciones de aminoácido conservativas y no conservativas en estas posiciones están también dentro del alcance de la invención. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácido: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácido: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; y M1<sup>183</sup>. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse también para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácido: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; y M1<sup>159</sup>. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse además para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir las siguientes sustituciones de aminoácido: PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); M1<sup>159</sup> (H159Q) M1<sup>183</sup> (M183V); y PA<sup>497</sup> (Y497H). Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir las siguientes sustituciones de aminoácido: PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); (M1<sup>159</sup> (H159Q) y/o M1<sup>183</sup> (M183V)); y PA<sup>497</sup> (Y497H). Se contempla específicamente que sustituciones de aminoácido conservativas y no conservativas en estas posiciones están también dentro del alcance descrito en el presente documento. Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que los virus resultantes tendrán todas las sustituciones preferidas. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado que comprenden o consisten alternativamente en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácido: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; M1<sup>159</sup>; M1<sup>183</sup>; y PA<sup>497</sup>.

Por consiguiente, virus influenza que incorporan las mutaciones son una característica también descrita en el presente documento independientemente del método en el que se producen. Es decir, se abarcan en el presente documento cepas de influenza que incluyen las mutaciones, por ejemplo, cualquier virus influenza A con una sustitución de aminoácido en relación con el tipo natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup> o cualquier virus influenza B con una sustitución de aminoácido en relación con el tipo natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>, con la condición de que las cepas B/Ann Arbor/1/66 y A/Ann Arbor/6/60 ca no se consideren una característica descrita en el presente documento. Los virus influenza A pueden incluir una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G); y los virus influenza B incluyen una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V), respectivamente. Se entenderá que algunos virus A pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que el virus resultante tendrá todas las sustituciones preferidas. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o pueden consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V). Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que el virus resultante tendrá todas las sustituciones preferidas. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o pueden consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); y M1<sup>183</sup> (M183V). Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que el virus resultante tendrá todas las sustituciones preferidas. Se contempla específicamente que sustituciones de aminoácido conservativas y no conservativas en estas posiciones están también dentro del alcance de la invención. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o pueden consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; y M1<sup>159</sup>. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; y M1<sup>183</sup>. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup>; NP<sup>114</sup>; NP<sup>410</sup>; y M1<sup>183</sup>. Las cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); M1<sup>159</sup> (H159Q) M1<sup>183</sup> (M183V); y PA<sup>497</sup> (Y497H). Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que el virus resultante tendrá todas las sustituciones preferidas. Las cepas de

- 5 influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o consistir alternativamente en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA<sup>431</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, M1<sup>159</sup>, M1<sup>183</sup>, y PA<sup>497</sup>. Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los residuos mencionados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se realizarían de manera que el virus resultante tendrá todas las sustituciones preferidas.
- Pueden introducirse una pluralidad de vectores de plásmido que incorporan el genoma del virus influenza en células huésped. Por ejemplo, pueden incorporarse segmentos de un genoma de virus influenza en al menos 8 vectores de plásmido. Pueden incorporarse segmentos de un genoma de virus influenza en 8 plásmidos. Por ejemplo, cada uno de los 8 plásmidos puede incorporar favorablemente un segmento diferente del genoma del virus influenza.
- 10 Los vectores pueden ser vectores de expresión bidireccional. Un vector de expresión bidireccional de la invención incluye normalmente un primer promotor y un segundo promotor, estando los promotores primero y segundo operativamente unidos a hebras alternativas del mismo ácido nucleico viral bicatenario que incluye un segmento del genoma del virus influenza. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o una secuencia terminadora. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia terminadora puede estar
- 15 ubicada flanqueando un segmento del genoma del virus influenza interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable puede ser la señal de poliadenilación de SV40. Un vector de plásmido a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.
- Puede ser adecuada cualquier célula huésped que pueda soportar la replicación de virus influenza a partir de los promotores del vector. Los ejemplos favorables de células huésped incluyen células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T) y células COS. En combinación con los vectores de plásmido pAD3000 descritos en el presente documento, células Vero, células 293 y células COS son particularmente adecuadas. Cultivos conjuntos de una mezcla de al menos dos de estas líneas celulares, por ejemplo, una combinación de células COS y MDCK o una combinación de células 293T y MDCK, constituyen la población de células huésped.
- 20 También se describe en el presente documento el cultivo de células huésped que incorporan los plásmidos de la invención a una temperatura inferior a 37°C, preferiblemente a una temperatura igual o inferior a 35°C. Normalmente, las células se cultivan a una temperatura entre 32°C y 35°C. En algunas realizaciones, las células se cultivan a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.
- También se describen en el presente documento métodos para rescatar virus influenza A o influenza B recombinantes o reordenantes (es decir, cepas de tipo natural y variantes de virus influenza A y/o influenza B) a partir de células Vero en cultivo. Se someten a electroporación una pluralidad de vectores que incorporan un genoma del virus influenza en una población de células Vero. Las células se hacen crecer en condiciones permisivas para la replicación viral, por ejemplo, en el caso de cepas de virus adaptados al frío, atenuados, sensibles a la temperatura, las células Vero se hacen crecer a una temperatura inferior a 37°C, preferiblemente a una temperatura igual o inferior a 35°C. Normalmente, las células se cultivan a una temperatura entre 32°C y 35°C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C. Opcionalmente (por ejemplo, para la producción de vacunas), las células Vero se hacen crecer en medio libre de suero sin ningún producto derivado de animales.
- 30 En los métodos descritos anteriormente, se recuperan virus tras el cultivo de las células huésped que incorporan los plásmidos con genoma de influenza. En algunas realizaciones, los virus recuperados son virus recombinantes. Los virus pueden ser virus influenza reordenantes que tienen contribuciones genéticas de más de una cepa de virus original. Opcionalmente, los virus recombinantes o reordenantes recuperados se amplifican adicionalmente mediante pase en células cultivadas o en huevos de gallina.
- 40 Opcionalmente, los virus recuperados se inactivan. Los virus recuperados pueden comprender una vacuna de influenza. Por ejemplo, la vacuna de influenza recuperada pueden ser virus influenza reordenantes (por ejemplo, virus reordenantes 6:2 ó 7:1) que tienen un antígeno de HA y/o NA derivado de una cepa de influenza A o influenza B seleccionada. Los virus influenza reordenantes pueden tener un fenotipo atenuado. Opcionalmente, los virus reordenantes están adaptados al frío y/o son sensibles a la temperatura, por ejemplo, un virus influenza B atenuado, adaptado al frío o sensible a la temperatura que tiene una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas de las sustituciones de la tabla 17. Tales virus influenza son útiles, por ejemplo, como vacunas atenuadas vivas para la producción profiláctica de una respuesta inmunitaria específica para una cepa de influenza seleccionada, por ejemplo, patógena. Virus influenza, por ejemplo, virus reordenantes atenuados, producidos según los métodos de la invención son una característica de la invención.
- 45 También se describen en el presente documento métodos para producir una vacuna del virus influenza recombinante que implican introducir una pluralidad de vectores que incorporan un genoma del virus influenza en una población de células huésped que pueden soportar la replicación del virus influenza, cultivar las células huésped a una temperatura inferior o igual a 35°C y recuperar un virus influenza que puede provocar una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto. Las vacunas de la invención pueden ser virus de las cepas o bien influenza A o bien influenza B. Los virus de la vacuna de influenza pueden incluir un virus influenza atenuado, un
- 55

virus influenza adaptado al frío o un virus influenza sensible a la temperatura. Los virus pueden tener una combinación de estas propiedades deseables. El virus influenza puede contener un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de influenza. El virus influenza puede incorporar también un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de influenza. Alternativamente, la vacuna incluye virus de influenza A o influenza B modificados por ingeniería genética artificialmente que incorporan al menos un aminoácido sustituido que influye en las propiedades biológicas características de A/Ann Arbor/6/60 ca o B/Ann Arbor/1/66 ca, tal como un aminoácido único de estas cepas. Por ejemplo, las vacunas pueden incluir virus influenza A recombinantes y reordenantes modificados por ingeniería genética artificialmente que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup> y virus influenza B recombinantes y reordenantes modificados por ingeniería genética artificialmente que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>.

El virus puede incluir un virus influenza reordenante (por ejemplo, un reordenante 6:2 ó 7:1) que tiene segmentos genómicos virales derivados de más de una cepa de virus influenza. Por ejemplo, una vacuna de virus influenza reordenante incluye favorablemente un antígeno de superficie de HA y/o NA derivado de una cepa de influenza A o B seleccionada, en combinación con los segmentos genómicos internos de una cepa de virus seleccionada por sus propiedades deseables con respecto a la producción de vacunas. A menudo, es deseable seleccionar la cepa de influenza a partir de la que se derivan los segmentos que codifican para HA y/o NA basándose en predicciones de prevalencia local o mundial de cepas patógenas (por ejemplo, tal como se describió anteriormente). En algunos casos, la cepa de virus que contribuye a los segmentos genómicos internos es una cepa de influenza atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, de A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66 o una cepa de influenza modificada por ingeniería genética artificialmente que tiene una o más sustituciones de aminoácido que dan como resultado el fenotipo deseado, por ejemplo, virus influenza A que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup> y virus influenza B que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>. Por ejemplo, los virus reordenantes favorables incluyen virus influenza A modificados por ingeniería genética artificialmente con una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas de entre PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G); y virus influenza B que incluyen una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas de entre PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V).

Si se desea, los virus de vacunas de influenza se inactivan tras su recuperación.

Vacunas de virus influenza, incluyendo vacunas vivas atenuadas, producidas mediante los métodos descritos en el presente documento son también una característica de la invención. Las vacunas de virus influenza son vacunas de virus reordenantes.

También se describen en el presente documento plásmidos que son vectores de expresión bidireccional. Los vectores de expresión bidireccional de la invención incorporan un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación, por ejemplo, un sitio de poliadenilación de SV40. El primer promotor y el segundo promotor pueden estar situados en orientaciones opuestas flanqueando al menos un sitio de clonación. Un vector a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.

Puede insertarse al menos un segmento de un genoma de virus influenza en el sitio de clonación, por ejemplo, como un ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, un vector de la invención incluye un plásmido que tiene un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación de SV40, estando situados el primer promotor y el segundo promotor en orientaciones opuestas flanqueando al menos un segmento de un virus influenza.

También se describen en el presente documento kits que incluyen uno o más vectores de expresión. Normalmente, los kits también incluyen uno o más de: una línea celular que puede soportar la replicación de virus influenza, un tampón, un medio de cultivo, un conjunto de instrucciones, un material de envasado y un recipiente. El kit puede incluir una pluralidad de vectores de expresión, cada uno de los cuales incluye al menos un segmento de un genoma de virus influenza. Por ejemplo, kits que incluyen una pluralidad de vectores de expresión que incluyen cada uno de los segmentos genómicos internos de una cepa de virus seleccionada, por ejemplo, seleccionada por sus propiedades deseables con respecto a la producción o administración de vacunas, son una característica de la invención. Por ejemplo, la cepa de virus seleccionada puede ser una cepa atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66 o una cepa alternativa con las propiedades deseadas, tal como una cepa modificada por ingeniería genética artificialmente que tiene una o más sustituciones de aminoácido tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la tabla 17. El kit puede incluir vectores de expresión que incorporan miembros de una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican para antígenos de HA y/o NA variantes.

Cultivos celulares que crecen de manera productiva que incluyen al menos una célula que incorpora una pluralidad de vectores que incluyen un genoma de virus influenza, a una temperatura inferior o igual a 35°C, es también una



característica de la invención. La composición también puede incluir un medio de cultivo celular. La pluralidad de vectores pueden incluir vectores de expresión bidireccional, por ejemplo, que comprenden un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación de SV40. Por ejemplo, el primer promotor y el segundo promotor pueden estar situados en orientaciones opuestas flanqueando al menos un segmento de un virus influenza. Los cultivos celulares se mantienen a una temperatura inferior o igual a 35°C, tal como entre aproximadamente 32°C y 35°C, normalmente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

También se describe en el presente documento un sistema de cultivo celular que incluye un cultivo celular que crece de manera productiva de al menos una célula que incorpora una pluralidad de vectores que comprenden un genoma de virus influenza, tal como se describió anteriormente, y un regulador para mantener el cultivo a una temperatura inferior o igual a 35°C. Por ejemplo, el regulador mantiene favorablemente el cultivo celular a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 35°C, normalmente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

También se describen en el presente documento virus influenza recombinantes o reordenantes modificados por ingeniería genética artificialmente que incluyen una o más sustituciones de aminoácido que influyen en la sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación. Por ejemplo, pueden ser favorables virus influenza A modificados por ingeniería genética artificialmente que tienen una o más sustituciones de aminoácido en una posición seleccionada de entre: PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup> y virus influenza B modificados por ingeniería genética artificialmente que tienen una o más sustituciones de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>. Por ejemplo, se incluyen virus influenza A con una cualquiera o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G); y virus influenza B con una cualquiera o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V). Los virus pueden incluir una pluralidad de mutaciones, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve sustituciones de aminoácido en posiciones identificadas anteriormente. Por consiguiente, también se describen en el presente documento virus influenza A modificados por ingeniería genética artificialmente que tienen sustituciones de aminoácido en las cinco posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G) y virus influenza B modificados por ingeniería genética artificialmente que tienen sustituciones de aminoácido en ocho o nueve de las posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V). Además, los virus pueden incluir una o más sustituciones de aminoácido adicionales no enumeradas anteriormente. Además, también se describen en el presente documento virus influenza A o B modificados por ingeniería genética artificialmente que tienen sustituciones de aminoácido en las siguientes cinco posiciones: PA<sup>431</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>. Además, los virus pueden incluir una o más sustituciones de aminoácido adicionales no enumeradas anteriormente.

Los virus influenza modificados por ingeniería genética artificialmente pueden ser virus influenza sensibles a la temperatura, virus influenza adaptados al frío y/o virus influenza atenuados. Por ejemplo, un virus influenza sensible a la temperatura según la invención normalmente presenta una reducción entre aproximadamente 2,0 y 5,0 log<sub>10</sub> en el crecimiento a 39°C en comparación con un virus influenza de tipo natural. Por ejemplo, un virus sensible a la temperatura presenta favorablemente una reducción de al menos aproximadamente 2,0 log<sub>10</sub>, al menos aproximadamente 3,0 log<sub>10</sub>, al menos aproximadamente 4,0 log<sub>10</sub> o al menos aproximadamente 4,5 log<sub>10</sub> en el crecimiento a 39°C en relación con el de un virus influenza de tipo natural. Normalmente, pero no necesariamente, un virus influenza sensible a la temperatura conserva características de crecimiento robustas a 33°C. Un virus influenza atenuado de la invención presenta normalmente una reducción de entre aproximadamente 2,0 y 5,0 log<sub>10</sub> en el crecimiento en un ensayo de atenuación en hurones en comparación con un virus influenza de tipo natural. Por ejemplo, un virus influenza atenuado de la invención presenta una reducción de al menos aproximadamente 2,0 log<sub>10</sub>, frecuentemente de aproximadamente 3,0 log<sub>10</sub> y favorablemente de al menos aproximadamente 4,0 log<sub>10</sub> en el crecimiento en un ensayo de atenuación en hurones en relación con virus influenza de tipo natural.

Puede proporcionarse un método para producir virus influenza en cultivo celular, comprendiendo el método: i) introducir una pluralidad de vectores que comprenden un genoma de virus influenza en una población de células huésped, población de células huésped que puede soportar la replicación de virus influenza; ii) cultivar la población de células huésped a una temperatura inferior o igual a 35°C; y iii) recuperar una pluralidad de virus influenza.

Los métodos anteriores pueden comprender introducir una pluralidad de vectores que comprenden al menos un virus B/Ann Arbor/1/66 influenza o un genoma de virus influenza B modificado por ingeniería genética artificialmente que codifica para al menos un aminoácido sustituido, aminoácido sustituido que influye en las propiedades biológicas características de B/Ann Arbor/1/66.

Los métodos anteriores pueden comprender introducir una pluralidad de vectores en una población de células huésped que comprenden al menos un virus B/Ann Arbor/1/66 influenza o un genoma de virus influenza B modificado por ingeniería genética artificialmente que codifica para al menos un aminoácido sustituido en las siguientes posiciones: PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, y NP<sup>509</sup>. El genoma del virus de la cepa influenza B puede comprender además un aminoácido sustituido en una o más de las siguientes posiciones: M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>.

- Los métodos anteriores comprenden introducir una pluralidad de vectores en una población de células huésped que comprenden al menos un virus B/Ann Arbor/1/66 influenza o un genoma de virus influenza B modificado por ingeniería genética artificialmente, codificando el genoma para una o más de las sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en: PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); y NP<sup>509</sup> (A509T). El genoma del virus de la cepa influenza B puede comprender al menos las cinco sustituciones de aminoácido.
- Se proporciona un método de producción de un virus influenza adaptado al frío (ca), comprendiendo el método: (a) introducir al menos una mutación en las siguientes posiciones de aminoácido: PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup> y NP<sup>509</sup> en un genoma de virus influenza B; y (b) replicar el genoma de virus influenza mutado en condiciones mediante las cuales se produce el virus.
- Se proporciona un método de producción de un virus influenza adaptado al frío (ca), comprendiendo el método: (a) introducir al menos las siguientes mutaciones: PB2<sup>630</sup> (S630R), PA<sup>431</sup> (V431M), NP<sup>114</sup> (V114A), NP<sup>410</sup> (P410H) y NP<sup>509</sup> (A509T) en un genoma de virus influenza B; y (b) replicar el genoma de virus influenza mutados en condiciones mediante las cuales se produce el virus.
- También se describe en el presente documento un método de producción de un virus influenza adaptado al frío (ca) que se replica eficazmente a 25°C, comprendiendo el método: (a) introducir al menos una mutación en las siguientes posiciones de aminoácido: PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup> y NP<sup>509</sup> en un genoma de virus influenza B; y (b) replicar el genoma de virus influenza mutado en condiciones mediante las cuales se produce el virus.
- También se describe en el presente documento un método de producción de un virus influenza adaptado al frío (ca) que se replica eficazmente a 25°C, comprendiendo el método: (a) introducir al menos las siguientes mutaciones: PB2<sup>630</sup> (S630R), PA<sup>431</sup> (V431M), NP<sup>114</sup> (V114A), NP<sup>410</sup> (P410H) y NP<sup>509</sup> (A509T) en un genoma de virus influenza B; y (b) replicar el genoma de virus influenza mutado en condiciones mediante las cuales se produce el virus.
- Se proporciona un virus influenza (y composiciones inmunogénicas que comprenden el mismo) producido mediante los métodos anteriores.
- Se proporciona un virus adaptado al frío (y composiciones inmunogénicas que comprenden el mismo) producido mediante los métodos anteriores.
- También se describe en el presente documento la identificación y manipulación de residuos de aminoácido en HA y NA que afectan a la replicación del virus influenza en células y huevos de pollo embrionados. Se describe además en el presente documento el uso de tecnología de genética inversa para generar variantes de vacunas de virus influenza de HA y NA con replicación mejorada en huevos de pollo embrionados y/o células. También se describen en el presente documento métodos para modular la actividad de unión al receptor de HA y/o la actividad neuraminidasa de NA. Adicionalmente, se describen en el presente documento virus influenza con capacidad potenciada para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células.
- También se describen en el presente documento métodos para manipular los residuos de aminoácido de HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus influenza para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células. El método implica la introducción de sustituciones de residuos de aminoácido en HA y/o NA y hace uso de métodos de producción de virus influenza en cultivo celular introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan un genoma de virus influenza en una población de células huésped que pueden soportar la replicación de virus influenza, cultivando las células y recuperando virus influenza. Preferiblemente, el virus influenza recuperado tiene una capacidad aumentada para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células. También se describen en el presente documento variantes de virus influenza con capacidad aumentada para replicarse en huevos de pollo embrionados (denominadas en el presente documento "variante(s) de influenza con replicación potenciada") en comparación con cepas virales de influenza no modificadas.
- Breve descripción de los dibujos**
- Figura 1: Ilustración del plásmido pAD3000 (SEQ ID NO: 94).
- Figura 2: Micrografías de células infectadas.
- Figura 3: Análisis de genotipado de VDMr-A y virus reordenante H1N1 6:2 a partir de la transfección de plásmidos.
- Figura 4: Ilustración del sistema de ocho plásmidos para la producción de virus influenza B.
- Figura 5: A y B. Caracterización del virus VDM-B mediante RT-PCR; C y D. Caracterización de B/Yamanashi/166/98 recombinante mediante RT PCR.
- Figura 6: Secuencia de pAD3000 en formato de GeneBank.
- Figura 7: Alineación de secuencias con VDM-B y ocho plásmidos (SEQ ID NO: 95-102).

- Figura 8: Productos de RT-PCR derivados de la amplificación simultánea de segmentos de HA y NA de cepas de influenza B.
- Figura 9: Gráfico de barras que ilustra títulos relativos de virus recombinante y reordenante.
- 5 Figura 10: Gráfico de barras que ilustra títulos relativos de virus reordenante a temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura).
- Figura 11: Representación gráfica de virus reordenantes que incorporan mutaciones específicas (activantes) que se correlacionan con la sensibilidad a la temperatura (panel izquierdo) y los títulos relativos a temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura) (panel derecho).
- 10 Figura 12: Determinación de mutaciones ts en un ensayo de minigenoma. A. Se transfectaron células HEp-2 con PB1, PB2, PA, NP y pFlu-CAT, se incubaron a 33 o 39°C durante 18 h y se analizaron extractos celulares para determinar la expresión del gen indicador CAT. B. Expresión de ARNm de CAT mediante ensayo de extensión del cebador.
- Figura 13: Ilustración esquemática de triples recombinantes génicos con residuos de tipo natural en proteínas PA, NP y M1.
- 15 Figura 14: Tabulación del crecimiento de virus dobles recombinantes génicos y únicos recombinantes génicos.
- Figura 15: Tabulación de residuos de aminoácido de la nucleoproteína correspondiente al fenotipo no ts.
- Figura 16: Diagrama esquemático de mutantes de PR8 recombinantes. Las mutaciones introducidas en los genes de PB1 y/o PB2 se indican mediante los puntos de color negro.
- Figura 17: Gráfico de barras que ilustra los títulos relativos a 33°C y 39°C.
- 20 Figura 18: Microfotografías que ilustran la morfología de placas de mutantes de PR8 a diversas temperaturas. Se infectaron células MDCK con virus tal como se indica y se incubaron a 33, 37 y 39°C durante tres días. Se visualizaron las placas de virus mediante inmunotinción y se fotografiaron.
- Figura 19: Síntesis de proteínas a temperaturas permisivas y no permisivas. Se infectaron células MDCK con virus tal como se indica y se incubaron a 33 o 39°C durante la noche. Se sometieron a electroforesis polipéptidos marcados radiomarcados en un SDS-PAGE y se sometieron a autorradiografía. Se indican las proteínas virales HA, NP, M1 y NS.
- 25 Figura 20: A. Gráficos de líneas que ilustran la replicación diferencial de VDM-A y VDM-B en células Pcr.C6 en relación con la replicación en células MDCK; B. Gráfico de líneas que ilustra la replicación diferencial de reordenantes génicos únicos de VDM-A en células Per.C6.
- 30 Figura 21: Gráficos de barras que ilustran la replicación diferencial de virus reordenantes. Los recuadros de color gris representan residuos de aminoácido de tipo natural. La línea de puntos representa la temperatura de desactivación (ts) de 2,0 log<sub>10</sub>.
- Figuras 22-23: Comparan de manera antigénica A/Panama/99 (H3N2) y de tipo A/Fujian/411/02 (H3N2).
- Figuras 24-28: Muestran la base molecular para la deriva antigénica desde A/Panama/99 hasta de tipo A/Fujian/02.
- 35 Figuras 29-35: Modificaciones en detalle en cepas para producir un aumento del crecimiento del virus en huevos embrionados.
- Figura 36: Afinidad de unión al receptor de HA de virus recombinantes. Se adsorbieron las variantes A/Fujian, A/Wyoming, A/Sendai y A/Fujian 6:2 con los cambios V186 y 1226 o L183 y A226 a células MDCK a una moi de 1,0 a 4°C o 33°C durante 30 min., y se lavaron las células infectadas tres veces (+) o se dejaron sin tratar (-). Tras 6 h de incubación a 33°C, se procesaron las células para la tinción de inmunofluorescencia. El porcentaje de células infectadas (media ± DE) indicado en cada imagen era un promedio de seis imágenes.
- 40 Figura 37: Cinética de crecimiento de virus recombinantes en células MDCK. Se infectaron células MDCK a una moi de 1,0 a o bien 33°C o bien 4°C durante 30 min., se lavaron 3x con PBS. Se incubaron las células infectadas a 33°C y a los intervalos de tiempo indicados se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se determinó la cantidad de virus mediante ensayo de placas.
- 45 Figura 38: Sitios de unión al receptor en los subtipos de HA y NA de H3N2. Se indican los residuos que se mostró que aumentaban la afinidad de unión al receptor de HA y que disminuían la actividad enzimática de NA en relación con los sitios de unión a ácido siálico (SIA). Se modeló el monómero de HA usando 5HMG y se modeló el monómero de NA basándose en 2BAT usando WebLab ViewerLite 3.10 (Accelrys, San Diego, CA).
- 50 **Descripción detallada**

La presente invención se define mediante la reivindicación. Muchas cepas de virus influenza patógenas crecen sólo de manera escasa en cultivo tisular, y cepas adecuadas para la producción de vacunas de virus atenuados vivos (por ejemplo, virus influenza sensibles a la temperatura, adaptados al frío y/o atenuados) no se han hecho crecer satisfactoriamente en células cultivadas para producción comercial. También se describe en el presente documento un sistema de transfección de múltiples plásmidos que permite el crecimiento y la recuperación de cepas de virus influenza que no están adaptadas para su crecimiento en condiciones de cultivo celular convencionales. Un desafío adicional en el desarrollo y la producción de vacunas de influenza es que una o más de las cepas de influenza circulantes pueden no replicarse bien en huevos de pollo embrionarios. Se identifican en el presente documento varios residuos de aminoácido que influyen en las actividades de las proteínas HA y NA y sustituciones de aminoácido específicos que pueden modular estas actividades. También se describe en el presente documento que la modulación de la actividad de unión al receptor de HA y/o la actividad neuraminidasa de NA puede potenciar la replicación de influenza en huevos y/o células huésped (por ejemplo, células Vero o MDCK). Se dan a conocer específicamente en el presente documento combinaciones de sustituciones de aminoácido en HA y/o NA que pueden potenciar la replicación viral en huevos y/o células y se demuestra que estas sustituciones de aminoácido no tienen impacto significativo sobre la antigenicidad de estos virus influenza recombinantes. Por tanto, se describe en el presente documento el uso de tecnología de genética inversa para mejorar la fabricación de vacunas de virus influenza.

Los métodos también descritos en el presente documento proporcionan vectores y métodos para producir virus influenza B recombinante en cultivo celular completamente a partir de ADN viral clonado. Los métodos pueden basarse en parte en el desarrollo de condiciones de cultivo tisular que soportan el crecimiento de cepas de virus (virus influenza tanto de la cepa A como de la cepa B) con propiedades deseables en relación con la producción de vacunas (por ejemplo, fenotipo o patogenicidad atenuada, adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, etc.) *in vitro* en células cultivadas. Se producen virus influenza introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan segmentos de genoma viral clonados en células huésped, y cultivando las células a una temperatura que no supera los 35°C. Cuando se transfectan vectores que incluyen un genoma de virus influenza, pueden recuperarse virus recombinantes adecuados como vacunas mediante procedimientos de purificación convencionales. Usando el sistema de vectores y los métodos de la invención, pueden producirse rápida y eficazmente en cultivo tisular virus reordenantes que incorporan los seis segmentos génicos internos de una cepa seleccionada por sus propiedades deseables con respecto a la producción de vacunas, y los segmentos de HA y NA inmunogénicos de una cepa seleccionada, por ejemplo patógena. Por tanto, el sistema y los métodos descritos en el presente documento son útiles para la producción rápida en cultivo celular de virus influenza A y B recombinantes y reordenantes, incluyendo virus adecuados para su uso como vacunas, incluyendo vacunas atenuadas vivas, tales como vacunas adecuadas para administración intranasal.

Normalmente, se selecciona una cepa de virus donador maestro (VDM) para cada uno de los subtipos A y B. En el caso de una vacuna atenuada viva, la cepa de virus donador maestro se elige normalmente por sus propiedades favorables, por ejemplo, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación, en relación con la producción de vacunas. Por ejemplo, las cepas donadoras maestras a modo de ejemplo incluyen tales cepas sensibles a la temperatura, atenuadas y adaptadas al frío de A/Ann Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66, respectivamente. Se dilucidan en el presente documento las mutaciones subyacentes que dan como resultado los fenotipos ca, ts y att de estas cepas de virus, y proporciona métodos para producir cepas novedosas de influenza adecuadas para su uso como cepas donadoras en el contexto de la producción de vacunas recombinantes y reordenantes.

Por ejemplo, se produce un virus donador maestro de tipo A (VDM-A) o un virus donador maestro de tipo B (VDM-B) seleccionados a partir de una pluralidad de ADNc virales clonados que constituyen el genoma viral. En una realización a modo de ejemplo, se producen virus recombinantes a partir de ocho ADNc virales clonados. Se clonan ocho ADNc virales que representan las secuencias de o bien VDM-A o bien VDM-B seleccionadas de PB2, PB1, PA, NP, HA, NA, M y NS en un vector de expresión bidireccional, tal como un plásmido (por ejemplo, pAD3000), de manera que puede transcribirse el ARN genómico viral a partir de un promotor de ARN polimerasa I (pol I) a partir de una hebra y pueden sintetizarse los ARNm virales a partir de un promotor de ARN polimerasa II (pol II) a partir de la otra hebra. Opcionalmente, puede modificarse cualquier segmento génico, incluyendo el segmento de HA (por ejemplo, para eliminar el sitio de escisión multibásico).

Se recupera entonces virus VDM-A o VDM-B recombinante infeccioso tras la transfección de plásmidos que llevan los ocho ADNc virales en células huésped apropiadas, por ejemplo, células Vero, células MDCK/293T o MDCK/COS7 cultivadas conjuntamente. Usando los plásmidos y métodos descritos en el presente documento, la presente descripción es útil, por ejemplo, para generar vacunas de influenza reordenantes 6:2 mediante cotransfección de los 6 genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) del virus seleccionado (por ejemplo, VDM-A, VDM-B) junto con la HA y NA derivadas de virus influenza de tipo correspondiente (A o B) diferentes. Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B patogénicamente relevante, tal como se realiza de manera rutinaria para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento HA puede seleccionarse de una cepa con relevancia emergente como cepa patógena tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). También pueden producirse reordenantes que incorporan siete segmentos genómicos del VDM y o bien el gen HA o bien el NA de una cepa seleccionada (reordenantes 7:1). Además, este sistema es útil para determinar la base molecular de características fenotípicas, por ejemplo los fenotipos atenuado (att), adaptado al frío (ca) y sensible a la temperatura (ts), relevantes para la producción de

vacunas.

5 También se describen en el presente documento métodos para manipular los residuos de aminoácido de HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus influenza para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para modular la actividad de unión al receptor de HA y/o la actividad neuraminidasa de NA para aumentar la capacidad de un virus influenza para replicarse en huevos y/o células. Adicionalmente, se describen en el presente documento virus influenza con capacidad potenciada para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células.

Definiciones

10 A menos que se defina lo contrario, se entiende que todos los términos científicos y técnicos tienen el mismo significado usado comúnmente en la técnica a la que pertenecen. Para el fin de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación.

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, o quimeras o análogos de los mismos. 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 se 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 de esta invención abarca secuencias complementarias, además de la secuencia explícitamente indicada.

20 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 las 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.

25 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.

30 El término “vector” se refiere a los medios mediante los que puede propagarse y/o transferirse un ácido nucleico entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones y cromosomas artificiales, y similares, que se replican 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 tanto por ADN como por ARN dentro de la 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 replican de manera autónoma. Lo más comúnmente, los vectores de la presente invención son plásmidos.

35 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 “operativamente unido” a un promotor y/o potenciador, y se somete a control regulatorio de la transcripción por el promotor y/o potenciador.

40 Un “vector de expresión bidireccional” se caracteriza normalmente por dos promotores alternativos orientados en la dirección opuesta en relación con un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de manera que la expresión puede iniciarse en ambas direcciones dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de tanto ARN de hebra positiva (+) o sentido como de ARN de hebra negativa (-) o antisentido. Alternativamente, el vector de expresión bidireccional puede ser un vector ambisentido, en el que el ARNm viral y el ARN genómico viral (como un ARNc) se expresan a partir de la misma hebra.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el mismo en su entorno que se produce de manera natural. El material aislado comprende opcionalmente material no encontrado con el material en su entorno natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su entorno natural, tal como una célula, el material se ha colocado en una ubicación en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativa para un 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 plásmido o vector de virus, o amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos se denominan también ácidos nucleicos “heterólogos”.

El término “recombinante” indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) se ha alterado

artificial o sintéticamente (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración puede realizarse sobre el material dentro, o retirado de, su estado o entorno natural. Específicamente, cuando se hace referencia a un virus, por ejemplo, un virus influenza, el virus es recombinante cuando se produce por la expresión de un ácido nucleico recombinante.

5 El término “reordenante”, cuando se hace referencia a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una fuente o cepa viral original. Por ejemplo, un reordenante 7:1 incluye 7 segmentos genómicos virales (o segmentos génicos) derivados de un primer virus original, y un segmento genómico viral complementario único, por ejemplo, que codifica para hemaglutinina o neuraminidasa, de un segundo virus original. Un reordenante 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.

10 El término “introducido” cuando se hace referencia a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procarionta 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 “traducción”. Pueden emplearse una variedad de métodos para introducir ácidos nucleicos en células procariontas, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

15 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, y opcionalmente la producción de uno o más productos codificados incluyendo un polipéptido y/o un virus. Las células huésped pueden ser células procariontas 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 en el contexto de la invención incluyen células Vero (riñón de mono verde africano), células Per.C6 (células de retina embrionaria humana), 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). El término célula huésped abarca combinaciones o mezclas de células incluyendo, por ejemplo, cultivos mixtos de diferentes tipos de células o líneas celulares (por ejemplo, células Vero y CEK). Se describe un cultivo conjunto de células Vero sf electroporadas por ejemplo en el documento PCT/US04/42669 presentado el 22 de diciembre de 2004.

20 Los términos “sensible a la temperatura”, “adaptado al frío” y “atenuado” se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el término “sensible a la temperatura” (“ts”) indica que el virus presenta una reducción de 100 veces o más en el título a 39°C en relación con 33°C para cepas de influenza A, y 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. Por ejemplo, el término “adaptado al frío” (“ca”) indica que el virus presenta crecimiento a 25°C dentro de 100 veces su crecimiento a 33°C. Por ejemplo, el término “atenuado” (“att”) indica que el virus se replica en las vías respiratorias superiores de hurones pero no puede detectarse en tejidos de pulmón, y no provoca enfermedad similar a la 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), que presentan crecimiento a 25°C que es más 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 atenuado) y/o enfermedad similar a la gripe reducida en el animal, que tienen una o más sustituciones de aminoácido descritas en el presente documento, son también virus útiles. El crecimiento indica la cantidad viral tal como se indica mediante el título, el tamaño o la morfología de las placas, la densidad de partículas u otras medidas conocidas por los expertos en la técnica.

25 La expresión “modificado por ingeniería genética artificialmente” se usa en el presente documento para indicar que el virus, ácido nucleico viral o producto codificado de manera viral, por ejemplo, un polipéptido, una vacuna, comprende al menos una mutación introducida por métodos recombinantes, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por PCR, etc. La expresión “modificado por ingeniería genética artificialmente” cuando se hace referencia a un virus (o producto o componente viral) que comprende una o más mutaciones de nucleótidos y/o sustituciones de aminoácido indica que el genoma viral o segmento genómico que codifica para el virus (o producto o componente viral) no se deriva de fuentes que se producen de manera natural, tal como una cepa de virus de laboratorio anteriormente existente o que se produce de manera natural producida por métodos no recombinantes (tal como pase progresivo a 25°C), por ejemplo, una cepa A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66 adaptada al frío o de tipo natural.

#### Virus influenza

30 El genoma de virus influenza está compuesto por ocho segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de hebra lineal (-), que codifica para las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) inmunogénicas, y seis polipéptidos de núcleo interno: la nucleoproteína (NP) de la nucleocápsida; proteínas de la matriz (M); proteínas no estructurales (NS); y 3 proteínas ARN polimerasa (PA, PB1, PB2). Durante la replicación, el ARN viral genómico se transcribe en

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

5 El ARN genómico viral correspondiente a cada uno de los ocho segmentos puede insertarse en un vector recombinante para la manipulación y producción de virus influenza. Pueden emplearse una variedad de vectores, incluyendo vectores virales, plásmidos, cósmidos, fagos y cromosomas artificiales en el contexto de la invención. Normalmente, para facilidad de manipulación, los segmentos genómicos virales se insertan en un vector de plásmido, proporcionando uno o más orígenes de replicación funcionales en células bacterianas y eucariotas y, opcionalmente, un marcador conveniente para examinar o seleccionar células que incorporan la secuencia de plásmido. Se ilustra un vector a modo de ejemplo, el plásmido pAD3000, en la figura 1.

10 Lo más comúnmente, los vectores de plásmido de la invención son vectores de expresión bidireccional que pueden iniciar la transcripción del segmento genómico viral insertado en cualquier dirección, es decir, dando lugar a moléculas de ARN viral tanto de hebra (+) como de hebra (-). Para efectuar la transcripción bidireccional, cada uno de los segmentos genómicos virales se inserta en un vector que tiene al menos dos promotores independientes, de manera que se transcriben copias de ARN genómico viral mediante un primer promotor de ARN polimerasa (por ejemplo, Pol I), a partir de una hebra, y se sintetizan ARNm virales a partir de un segundo promotor de ARN polimerasa (por ejemplo, Pol II). Por consiguiente, los dos promotores están dispuestos en orientaciones opuestas flanqueando al menos un sitio de clonación (es decir, una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción), preferiblemente un único sitio de clonación, adecuado para la inserción de segmentos de ARN genómico viral.

15 Alternativamente, puede emplearse un vector "ambisentido" en el que se transcriben el ARNm de hebra (+) y el ARN viral de hebra (-) (como un ARNc) a partir de la misma hebra del vector.

20

#### Vectores de expresión

25 El segmento genómico de virus influenza que va a expresarse está operativamente unido a una secuencia de control de la transcripción apropiada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Son adecuados una variedad de promotores para su uso en vectores de expresión para regular la transcripción de segmentos genómicos de virus influenza. Por ejemplo, cuando el vector es el plásmido pAD3000, se utiliza el promotor de ARN polimerasa II (Pol II) dependiente de ADN de citomegalovirus (CMV). Si se desea, por ejemplo, para regular la expresión condicional, pueden sustituirse otros promotores que inducen la transcripción del ARN en las condiciones especificadas, o en las células o los tejidos especificados. Están disponibles numerosos promotores virales y de mamífero, 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 los promotores de 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 mamífero incluyen, entre muchos otros, el promotor de actina, promotores de inmunoglobulinas, promotores de choque térmico, y similares. Además, pueden emplearse

30 promotores de bacteriófagos conjuntamente con la ARN polimerasa relacionada, por ejemplo, el promotor de T7.

35

La transcripción se aumenta opcionalmente incluyendo una secuencia potenciadora. Los potenciadores son normalmente elementos de ADN de actuación en cis cortos, por ejemplo, de 10-500 pb, que actúan conjuntamente con un promotor aumentando 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 en 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 la que va a introducirse el ADN heterólogo (Scharf *et al.* (1994) Heat stress promoters and transcription factors, *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Kriegler *et al.* (1990) Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes, *Methods in Enzymol* 185: 512-27). Opcionalmente, el amplicón también puede contener un sitio de unión a ribosomas o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para el inicio de la traducción.

40

45

Los vectores de la invención 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 a partir de las regiones no traducidas en 5' y, ocasionalmente, en 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Por ejemplo, en relación con el plásmido pAD3000, las secuencias de poliadenilación de SV40 proporcionan una señal de poliadenilación.

50

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.

55

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada tal como se describió anteriormente, así como una secuencia de control o promotora apropiada, puede emplearse para transformar una célula huésped que permite la expresión de la proteína. Aunque los vectores pueden replicarse en células bacterianas, lo más frecuentemente será deseable

introducirlas en células de mamífero, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293, células COS, para el fin de expresión.

Elementos de expresión adicionales

5 Lo más comúnmente, el segmento genómico que codifica para la proteína de virus influenza incluye cualquier  
 10 secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo su 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 HA o NA. En este caso, es deseable a menudo incluir señales de iniciación específicas que  
 ayudan en la traducción eficaz de la secuencia codificante heteróloga. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el  
 15 codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Para garantizar la traducción de todo el inserto, el codón de  
 20 iniciación se inserta en el marco de lectura correcto en relación con la proteína viral. Codones de iniciación y  
 elementos transcripcionales exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia  
 de la 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  
 15 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 dirigir la expresión del  
 polipéptido a un compartimento celular, membrana u orgánulo deseado, o al medio de cultivo celular. Tales  
 20 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 detención de la  
 25 transferencia, secuencias de anclaje GPI), y similares.

Vacuna de virus influenza

Históricamente, se han producido vacunas de virus influenza en huevos de gallina embrionados usando cepas de  
 virus seleccionadas basándose en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han  
 25 producido virus reordenantes que incorporan antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el  
 contexto de una cepa maestra atenuada, sensible a la temperatura 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. Sin embargo, la producción de vacuna de influenza de esta manera tiene  
 varias desventajas significativas. Los contaminantes que quedan de los huevos de gallina son altamente antigénicos,  
 30 pirogénicos y frecuentemente dan como resultado efectos secundarios significativos tras su administración. De  
 manera más importante, deben seleccionarse y distribuirse cepas designadas para la producción normalmente  
 meses de antemano de la siguiente temporada de gripe para dejar tiempo para la producción e inactivación de la  
 vacuna de influenza. Los intentos de producir vacunas recombinantes y reordenantes en cultivo celular se han visto  
 35 dificultados por la incapacidad de cualquiera de las cepas aprobadas para la producción de vacunas para crecer  
 eficazmente en condiciones de cultivo celular convencionales.

También se describe en el presente documento un sistema de vectores, y métodos para producir virus  
 40 recombinantes y reordenantes en cultivo que hacen posible producir rápidamente vacunas que corresponden a una  
 o muchas cepas antigénicas seleccionadas de virus. En particular, se proporcionan condiciones y cepas que dan  
 como resultado una producción eficaz de virus a partir de un sistema de múltiples plásmidos en cultivo celular.  
 Opcionalmente, si se desea, los virus pueden amplificarse además en huevos de gallina.

Por ejemplo, no ha sido posible hacer crecer la cepa maestra de influenza B B/Ann Arbor/1/66 en condiciones de  
 45 cultivo celular convencionales, por ejemplo, a 37°C. En los métodos descritos en el presente documento, se  
 introducen múltiples plásmidos, que incorporan cada uno un segmento de un genoma de virus influenza, en células  
 adecuadas, y se mantienen en cultivo a una temperatura inferior o igual a 35°C. Normalmente, los cultivos se  
 mantienen a entre aproximadamente 32°C y 35°C, preferiblemente entre aproximadamente 32°C y aproximadamente  
 34°C, por ejemplo, a aproximadamente 33°C.

Normalmente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como un incubador de cultivo celular, bajo CO<sub>2</sub> y  
 humedad controlada, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para  
 garantizar que la temperatura no supera los 35°C.

Pueden obtenerse fácilmente virus influenza reordenantes introduciendo un subconjunto de vectores  
 50 correspondientes a segmentos genómicos de un virus influenza maestro, en combinación con segmentos  
 complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de interés). 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 donador maestro puede seleccionarse para un fenotipo atenuado, con adaptación al frío y/o sensibilidad a la  
 55 temperatura. En este contexto, la cepa de influenza A A/Ann Arbor/6/60 ca; la cepa de influenza B B/Ann Arbor/1/66  
 ca; u otra cepa seleccionada por sus propiedades fenotípicas deseables, por ejemplo, una cepa atenuada, adaptada  
 al frío y/o sensible a la temperatura, tal como una cepa de influenza A modificada por ingeniería genética  
 artificialmente tal como se describe en el ejemplo 4; o una cepa de influenza B modificada por ingeniería genética



artificialmente que incorpora una o más de las sustituciones de aminoácido especificadas en la tabla 17 se seleccionan favorablemente como cepas donadoras maestras.

Pueden transfectarse plásmidos que incorporan los seis genes internos de la cepa de virus influenza maestro, (es decir, PB1, PB2, PA, NP, NB, M1, BM2, NS1 y NS2) en células huésped adecuadas en combinación con segmentos de hemaglutinina y neuraminidasa de una cepa antigénicamente deseable, por ejemplo, una cepa que se pronostica que causa infección por influenza local o global significativa. Tras la replicación del virus reordenante en cultivo celular a temperaturas apropiadas para una recuperación eficaz, por ejemplo, igual a o inferior a 35°C, tal como entre aproximadamente 32°C y 35°C, por ejemplo entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, o a aproximadamente 33°C, se recuperan virus reordenantes. Opcionalmente, el virus recuperado puede inactivarse usando un agente desnaturalizante tal como formaldehído o β-propiolactona.

Vacunas de virus influenza atenuado, sensible a la temperatura y adaptado al frío

También se describe en el presente documento la determinación de las mutaciones que subyacen al fenotipo ts en las cepas donadoras maestras de virus. Para determinar la importancia funcional de cambios de nucleótidos únicos en el genoma de la cepa de VDM, se evaluaron virus reordenantes derivados de células altamente relacionadas dentro del linaje de A/AA/6/60 para determinar la sensibilidad a la temperatura. La naturaleza isogénica de las dos cepas originales permite la evaluación de cambios de nucleótidos únicos sobre el fenotipo ts. Por consiguiente, se mapea la base genética para el fenotipo ts de VDM-A al nivel de nucleótidos con respecto a residuos de aminoácido específicos dentro de PB1, PB2 y NP.

Intentos anteriores de mapear la base genética del fenotipo ts de A/AA/6/60 ca utilizaron técnicas de reordenamiento/coinfección clásicas para crear reordenantes de genes múltiples y únicos entre A/AA/6/60 y una cepa wt no relacionada. Estos estudios sugirieron que tanto PB2 como PB1 contribuían al fenotipo ts (Kendal *et al.* (1978) Biochemical characteristics of recombinant viruses derived at sub-optimal temperatures: evidence that ts lesions are present in RNA segments 1 and 3, and that RNA 1 codes for the virion transcriptase enzyme, págs. 734-743. En B. W. J. Mahy, y R.D. Barry (ed.) Negative Strand Viruses, Academic Press; Kendal *et al.* (1977) Comparative studies of wild-type and cold mutant (temperature sensitive) influenza viruses: genealogy of the matrix (M) and the non-structural (NS) proteins in recombinant cold-adapted H3N2 viruses, J Gen Virol 37:145-159; Kendal *et al.* (1979) Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature sensitive) influenza viruses: independent segregation of temperature-sensitivity of virus replication from temperature-sensitivity of virion transcriptase activity during recombination of mutant A/Ann Arbor/6/60 with wild-type H3N2 strains, J Gen Virol 44:443-456; Snyder *et al.* (1988) Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines, J Virol 62:488-95). Sin embargo, la interpretación de estos estudios se vio confundida por efectos de constelación, que se provocaron al mezclar segmentos génicos de cepas de influenza A divergentes. Podrían haberse producido interacciones debilitadas a través de cambios entre la A/AA/6/60 y segmentos génicos wt distintos de los implicados específicamente en la expresión del fenotipo ts a partir del A/AA/6/60 antecedente. También se mostró que efectos de constelación confundían la interpretación de la asociación del segmento génico M con el fenotipo att (Subbarao *et al.* (1992) The attenuation phenotype conferred by the M gene of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted virus (H2N2) on the A/Korea/82 (H3N2) reassortant virus results from a gene constellation effect, Virus Res 25:37-50).

En el presente documento, se identifican mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácido en las posiciones PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup> como funcionalmente importantes para conferir el fenotipo sensible a la temperatura sobre el virus de la cepa VDM-A. Tal como entenderán los expertos en la técnica, mutaciones en nucleótidos en las posiciones PB1<sup>1195</sup>, PB1<sup>1766</sup>, PB1<sup>2005</sup>, PB2<sup>821</sup> y NP<sup>146</sup> designan sustituciones de aminoácido en PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup>, respectivamente. Por tanto, cualquier sustitución de nucleótido que dé como resultado aminoácidos sustituidos en estas posiciones es una característica de la invención. Las mutaciones a modo de ejemplo PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G), individualmente, y más preferiblemente en combinación, dan como resultado un fenotipo sensible a la temperatura. La reversión simultánea de estas mutaciones al tipo natural suprime el fenotipo ts, mientras que la introducción de estas mutaciones sobre un antecedente de tipo natural da como resultado virus con un fenotipo ts. De manera consecuente con la estabilidad de estos fenotipos durante el pase del virus, ningún cambio único puede revertir individualmente el perfil de sensibilidad a la temperatura del virus resultante al del tipo natural. Más bien, estos cambios parecen actuar conjuntamente entre sí para expresar completamente el fenotipo ts. Este descubrimiento permite la modificación por ingeniería genética de cepas adicionales de virus influenza A sensible a la temperatura adecuadas para virus donadores maestros para la producción de vacunas de influenza atenuadas vivas.

De manera similar, sustituciones de aminoácido individuales en una cepa de virus donador maestro-B se correlacionan con el fenotipo ts tal como se ilustra en la tabla 17. Por tanto, los métodos presentados en el presente documento están adaptados para producir cepas de influenza B novedosas con fenotipos sensible a la temperatura, y opcionalmente atenuado y/o adaptado al frío introduciendo una o más mutaciones especificadas en un genoma de influenza B. Por ejemplo, se introducen una o más mutaciones que dan como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup> en un genoma de cepa de influenza B para producir un virus influenza B sensible a la temperatura. Las sustituciones de aminoácido a modo de ejemplo incluyen las siguientes: PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup>

(T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V).

También se describen en el presente documento virus influenza que incorporan la mutación descrita en el presente documento independientemente del método en el que se producen. Es decir, se abarcan en el presente documento cepas de influenza que incluyen las mutaciones de la invención, por ejemplo, cualquier virus influenza A con una sustitución de aminoácido en relación con el tipo natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: PB1<sup>391</sup>, PB1<sup>581</sup>, PB1<sup>661</sup>, PB2<sup>265</sup> y NP<sup>34</sup> o cualquier virus influenza B con una sustitución de aminoácido en relación con el tipo natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: PB2<sup>630</sup>, PA<sup>431</sup>, PA<sup>497</sup>, NP<sup>55</sup>, NP<sup>114</sup>, NP<sup>410</sup>, NP<sup>509</sup>, M1<sup>159</sup> y M1<sup>183</sup>, con la condición de que las cepas B/Ann Arbor/1/66 y A/Ann Arbor/6/60 ca no se consideran una característica de la presente invención. Los virus influenza A pueden incluir una pluralidad de mutaciones (por ejemplo, dos, o tres, o cuatro, o cinco o más mutaciones) seleccionadas de entre PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G), PB1<sup>661</sup> (A661T), PB2<sup>265</sup> (N265S) y NP<sup>34</sup> (D34G); y los virus influenza B incluyen una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V), respectivamente. Por ejemplo, además de proporcionar virus con fenotipos deseados relevantes para la producción de vacunas, virus con un subconjunto de mutaciones, por ejemplo, 1, ó 2, ó 3, ó 4 ó 5 mutaciones seleccionadas son útiles para dilucidar la contribución de mutaciones adicionales al fenotipo del virus. Los virus influenza pueden incluir al menos un nucleótido que no es de tipo natural adicional (por ejemplo, dando como resultado posiblemente una sustitución de aminoácido adicional), que refina opcionalmente el fenotipo deseado o confiere un atributo fenotípico deseable adicional.

#### Replicación viral potenciada

También se describe en el presente documento un método de introducción de al menos una sustitución de residuo de aminoácido en HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus influenza para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células huésped. Se describen además en el presente documento variantes de virus influenza con capacidad aumentada para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células huésped (denominadas en el presente documento "variantes con replicación potenciada") en comparación con virus influenza no sustituido en HA y/o NA. Se contempla específicamente que el método puede utilizarse para potenciar la replicación de un virus influenza en una célula huésped y que las variantes con replicación potenciada pueden tener replicación potenciada en huevos de pollo y/o células huésped. Las células huésped adecuadas para la replicación de virus influenza incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7. El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido en HA y/o NA que potenciará la capacidad de un virus influenza para replicarse en huevos y/o células huésped en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%, o en al menos el 300%, o el al menos el 400%, o en al menos el 500% en comparación con el virus influenza no modificado. Se contempla específicamente que pueden hacerse sustituciones de aminoácido tanto en HA como en NA. Preferiblemente, el método no altera significativamente la antigenicidad del virus influenza sustituido en comparación con el virus no sustituido. El método puede reducir la antigenicidad del virus influenza sustituido en comparación con el virus no sustituido en menos del 10%, o en menos del 20%, o en menos del 30%, o en menos del 40%, o en menos del 50%, o en menos del 60%, o en menos del 70%, o en menos del 80%, o en menos del 90%, o en menos del 100%. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la antigenicidad viral (véase también el "Ejemplo 11" a continuación).

El método puede incorporar además un virus influenza atenuado, un virus influenza adaptado al frío, un virus influenza sensible a la temperatura o un virus con cualquier combinación de estas propiedades deseables. Preferiblemente, los virus incorporados por el método incluyen pero no se limitan a, virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66 de influenza, virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de influenza. El método puede introducir vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa viral seleccionada por sus propiedades favorables con respecto a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos genómicos que codifican para los antígenos de superficie HA y NA manipulados deseados para producir virus influenza con capacidad potenciada para replicarse en huevos de pollo embrionados y/o células huésped (véase anteriormente y el "Ejemplo 11"). El método de la invención puede incorporar además un virus influenza no atenuado.

El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido que modula la actividad de unión al receptor de HA. La actividad de unión al receptor de HA incluye pero no se limita a la unión de HA a residuos de ácido siálico (por ejemplo, restos sialil-galactosilo unidos en 2,6 [Sia $\alpha$ (2,6)Gal] y restos sialil-galactosilo unidos en 2,3 [Sia $\alpha$ (2,3)Gal]) presentes en los glicolípidos o las glicoproteínas de la superficie celular. Se presenta un método para someter a ensayo la unión de HA en el "Ejemplo 11" (a continuación), se conocen bien en la técnica otros métodos. El método de la invención puede introducir sustituciones de aminoácido que modulan la especificidad de unión al receptor de HA para restos [Sia $\alpha$ (2,6)Gal] y/o [Sia $\alpha$ (2,3)Gal]. Preferiblemente, el método potenciará la unión de HA a restos [Sia $\alpha$ (2,3)Gal].

El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido, que potencia la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se aumenta en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido, que reduce la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se reduce en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

5 El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido en HA en las posiciones 183, 186, 196 y/o 226. Pueden hacerse sustituciones de aminoácido en las posiciones 183 y 226 o en las posiciones 186 y 226 o en las posiciones 183 y 196, o en las posiciones 186 y 196, o en las posiciones 196 y 226, o en las posiciones 183, 196 y 226. Se hacen sustituciones de aminoácido en cualquiera de las posiciones 183, 186, 196 o 226, se hacen las sustituciones de manera que estas posiciones dan como resultado los siguientes aminoácidos: 183-leucina, 186-valina, 196-treonina y posición 226-alanina. Los cambios en estas posiciones pueden hacerse de manera que se hace un cambio de aminoácido conservativo con respecto a los cambios descritos anteriormente. Puede hacerse la sustitución en una o más de las posiciones de residuos de HA seleccionadas del grupo que consiste en: 183 (por ejemplo, H183L), 186 (por ejemplo, G186V), 196 (por ejemplo, A196T) y 226 (por ejemplo, V226A).

15 El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido que modula la actividad neuraminidasa de NA. La actividad neuraminidasa de NA incluye pero no se limita a, la hidrólisis de sustratos que contienen ácido N-acetilneuramínico unido de manera alfa-cetosídica (Neu5Ac). Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la actividad neuraminidasa (véase también el "Ejemplo 11" a continuación).

20 El método de la invención puede introducir al menos una sustitución de aminoácido que potencia la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se aumenta en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

25 El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido que reduce la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad neuraminidasa se reduce en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácido en NA en las posiciones 119 y/o 136. Preferiblemente, se hacen sustituciones de aminoácido de manera que la posición 119 es un glutamato y la posición 136 es una glutamina.

30 Un experto en la técnica apreciaría que en algunos casos la proteína HA y/o NA tendrá ya los residuos de aminoácido preferidos en una o más de las posiciones mencionadas anteriormente. En esta situación, sólo se introducirá(n) sustitución/sustituciones en las posiciones no coincidentes restantes.

Se contempla específicamente que pueden hacerse sustituciones de aminoácido conservativas para dichas sustituciones de aminoácido en las posiciones 183, 186, 196 y/o 226 de HA y las posiciones 119 y/o 136 de NA, descritas anteriormente.

35 Se sabe bien en la técnica que "sustitución de aminoácido conservativa" se refiere a sustituciones de aminoácido que sustituyen aminoácidos funcionalmente equivalentes. Cambios de aminoácidos conservativos dan como resultado cambios silenciosos en la secuencia de aminoácidos del péptido resultante. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de una polaridad similar actúan como equivalentes funcionales y dan como resultado una alteración silenciosa dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido. Sustituciones que son de carga neutra y que reemplazan un residuo por un residuo más pequeño también pueden considerarse "sustituciones conservativas" incluso si los residuos están en diferentes grupos (por ejemplo, reemplazo de fenilalanina por la isoleucina más pequeña). Se han identificado en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Las familias de sustituciones de aminoácido conservativas incluyen pero no se limitan a, no polares (por ejemplo, Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro), polares no cargados (por ejemplo, Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys), ácidos/cargados negativamente (por ejemplo, Asp, Glu), básicos/cargados positivamente (por ejemplo, Arg, Lys, His), ramificados en beta (por ejemplo, Thr, Val, Ile), residuos que influyen en la orientación de la cadena (por ejemplo, Gly, Pro) y aromáticos (por ejemplo, Trp, Tyr, Phe, His). El término "sustitución de aminoácido conservativa" también se refiere al uso de variantes o análogos de aminoácidos. Se proporciona orientación referente a cómo hacer sustituciones de aminoácido fenotípicamente silenciosas en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Substitutions of amino acids", (1990, Science 247:1306-10).

55 También se describen en el presente documento virus influenza modificados, denominados en el presente documento "variante(s) de influenza con replicación potenciada", que incorporan al menos una sustitución de aminoácido en HA y/o NA que potencia su replicación en huevos de pollo embrionados y/o células huésped en comparación con el virus influenza no modificado. Preferiblemente, la capacidad de una variante de influenza con replicación potenciada para replicarse en huevos y/o células huésped se ha potenciado en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%, o en al menos el 300%, o en al menos el 400%, o en al menos el 500% en comparación con el virus influenza no

modificado.

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

Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido en HA que modula la actividad de unión al receptor de HA (véase anteriormente). Preferiblemente, el método potenciará la unión de HA a restos [Sia $\alpha$ (2,3)Gal].

15 Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido que potencia la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se aumenta en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%. Se contempla específicamente que una variante de influenza potenciada en huevos no tiene antigenicidad viral significativamente alterada en comparación con el virus influenza no sustituido. Una variante de  
20 influenza con replicación potenciada puede tener una antigenicidad que se reduce en menos del 10%, o en menos del 20%, o en menos del 30%, o en menos del 40%, o en menos del 50%, o en menos del 60%, o en menos del 70%, o en menos del 80%, o en menos del 90%, o en menos del 100% en comparación con virus no sustituido. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la antigenicidad viral (véase también el “Ejemplo 11” a continuación).

25 Una variante de influenza potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido que reduce la actividad de unión al receptor de HA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se reduce en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

30 Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido en HA en las posiciones 183, 186, 196 y/o 226. Pueden hacerse sustituciones de aminoácido en las posiciones 183 y 226 o en las posiciones 186 y 226 o en las posiciones 183 y 196, o en las posiciones 186 y 196, o en las posiciones 196 y 226, o en las posiciones 183, 196 y 226. En una realización específica, si se hacen sustituciones de aminoácido en cualquiera de las posiciones 183, 186, 196 ó 226, se hacen las sustituciones de manera que estas  
35 posiciones dan como resultado los siguientes aminoácidos: 183-leucina, 186-valina, 196-treonina y posición 226-alanina. Los cambios en estas posiciones pueden hacerse de manera que se hace un cambio de aminoácido conservativo con respecto a los cambios descritos anteriormente.

40 También se describe en el presente documento un método de aumento de la replicación de un virus influenza reordenante en al menos el 10% comprendiendo el método las etapas de: a) comparar la secuencia de aminoácidos del virus influenza reordenante con la secuencia de aminoácidos de un virus influenza diferente que se replica hasta un título superior en huevos embrionados; y b) alterar uno o más aminoácidos de la secuencia del virus reordenante para que coincida con la secuencia del virus influenza diferente, produciendo de ese modo uno o más virus reordenantes alterados, y c) hacer crecer el uno o más virus reordenantes alterados en huevos. También se describen en el presente documento virus influenza producidos mediante estos métodos.

45 También se proporciona un virus influenza reordenante con replicación potenciada que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en: a) una proteína HA que comprende una leucina en la posición 183 y una alanina en la posición 226; (b) una proteína HA que comprende una valina en la posición 186 y una isoleucina en la posición 226; (c) una proteína NA que comprende un glutamato en la posición 119 y una glutamina en la posición 136; (d) una proteína HA que comprende una valina en la posición 186 y una isoleucina en la posición 226 y una  
50 proteína NA que comprende un glutamato en la posición 119 y una glutamina en la posición; (e) una proteína HA que comprende una valina en la posición 186, una isoleucina en la posición 226 y una treonina en la posición 196; y (f) una proteína HA que comprende una treonina en la posición 196; y (g) una sustitución en la proteína HA en las posiciones 186 y 196. También se proporcionan vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden los virus influenza.

55 También se describe en el presente documento un método de aumento de la replicación de un virus influenza en al menos el 10% o al menos 20% o al menos 50% o al menos 80%, comprendiendo el método las etapas de: a) hacer sustituciones de aminoácido según se necesite en una o más de las siguientes posiciones de HA: 183, 186, 196 ó 226, de manera que tales sustituciones, si se hacen, dan como resultado un residuo de leucina en la posición 183, una valina en la posición 186, una treonina en la posición 196 y una alanina en la posición 226, y b) hacer crecer el

virus influenza que comprende las sustituciones en HA en huevos. También se proporcionan vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden los virus influenza.

5 También se describen en el presente documento virus influenza reordenantes que comprenden una sustitución en una o más de las siguientes posiciones: 183, 186, 196 ó 226, creciendo el virus influenza hasta un título de al menos 8,0 log<sub>10</sub> UFP/ml, o al menos 8,5 log<sub>10</sub> UFP/ml, o al menos 9,0 log<sub>10</sub> UFP/ml en huevos embrionados. También se proporcionan vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden los virus influenza.

10 También se describen en el presente documento virus influenza reordenantes que comprenden una sustitución en una o más de las siguientes posiciones: 183, 186, 196 ó 226, creciendo el virus influenza hasta un título al menos el 50% superior, o al menos el 80% superior, o al menos el 100% superior que el mismo virus reordenante en el que no se ha hecho la sustitución. También se proporcionan vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden los virus influenza.

15 También se describen en el presente documento virus influenza reordenantes que comprenden una sustitución en una o más de las siguientes posiciones: 183, 186, 196 ó 226, en los que al menos una sustitución da como resultado un aminoácido con cadenas laterales polares no cargadas, por ejemplo, serina, en la posición 196 o un aminoácido distinto de alanina con cadenas laterales no polares, por ejemplo, valina, en la posición 186. También se describen en el presente documento virus influenza reordenantes que comprenden una sustitución en una o más de las siguientes posiciones: 183, 186, 196 ó 226, en los que una sustitución da como resultado un aminoácido con cadenas laterales polares no cargadas, por ejemplo, serina, en la posición 196 y un aminoácido distinto de alanina con cadenas laterales no polares, por ejemplo, valina, en la posición 186. También se proporcionan vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden los virus influenza.

20 Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido que modula la actividad neuraminidasa de NA (véase anteriormente).

25 Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido que potencia la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad de unión al receptor se aumenta en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

30 Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido que reduce la actividad neuraminidasa de NA. Preferiblemente, la actividad neuraminidasa se reduce en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o en al menos el 100%, o en al menos el 200%.

35 Una variante de influenza con replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácido en NA en las posiciones 119 y/o 136. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido se hacen de manera que entonces la posición 119 es un glutamato y la posición 136 es una glutamina.

#### Cultivo celular

40 Normalmente, la propagación del virus se logra en las composiciones de medios en las que la célula huésped se cultiva comúnmente. Las células adecuadas para la replicación del virus influenza incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7. Comúnmente, se emplean cultivos conjuntos que incluyen dos de las líneas celulares anteriores, por ejemplo, células MDCK y células o bien 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 concentración de CO<sub>2</sub> y humedad controlada adecuada para mantener un pH tamponado neutro (por ejemplo, a pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para impedir el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomina, 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.

50 Se han notificado de manera extensa procedimientos para mantener células de mamífero en cultivo, y se conocen por los expertos en la técnica. Se proporcionan protocolos generales, por ejemplo, en Freshney (1983) *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan R Liss, Nueva York; Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edinburgh; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam. Los detalles adicionales con respecto a procedimientos de cultivo de tejidos de particular interés en la producción de virus influenza *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten *et al.* (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*. En Cohen and Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Adicionalmente, se determinan fácilmente variaciones en tales procedimientos adaptados a la presente invención a través de experimentación de rutina.

Pueden cultivarse células para la producción de virus influenza en medio que contiene suero o libre de suero. En algún caso, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, 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 o frascos de cultivo o en grandes frascos con agitación, en botellas rotatorias o en perlas microportadoras (por ejemplo, perlas microportadoras de DEAE-dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-tri-metilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en frascos, botellas o cultivos en reactor. Las perlas microportadoras son pequeñas esferas (en el intervalo de 100-200 micrómetros de diámetro) que proporcionan un gran área de superficie para el crecimiento de células adherentes por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un único litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas 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 por debajo de 1 litro hasta un exceso de 100 litros, por ejemplo, el biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores de laboratorio y a escala comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, es importante que los cultivos descritos en el presente documento se mantengan a una temperatura inferior o igual a 35°C, para garantizar una recuperación eficaz de virus influenza recombinante y/o reordenante usando el sistema de múltiples plásmidos descrito en el presente documento. Por ejemplo, las células se cultivan a una temperatura entre aproximadamente 32°C y 35°C, normalmente a una temperatura entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 34°C, habitualmente a aproximadamente 33°C.

Normalmente, se emplea un regulador, por ejemplo un termostato, u otro dispositivo para detectar y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular, para garantizar que la temperatura no supera los 35°C durante el periodo de replicación del virus.

#### Introducción de vectores en células huésped

Se introducen vectores que comprenden segmentos genómicos de influenza (por ejemplo, se transfectan) 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 transferirse vectores, por ejemplo, plásmidos, a 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. Aproximadamente 1 µg de cada vector va a introducirse en la población de células huésped con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferiblemente medio libre de suero, en un vol. total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incuban a temperatura ambiente durante 45 min. seguido por adición de 800 µl de medio. La mezcla de transfección se añade a las células huésped, y las células se cultivan tal como se describió anteriormente. Por consiguiente, para la producción de virus recombinantes o reordenantes en cultivo celular, se mezclan vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos genómicos (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se transfectan en células huésped. Opcionalmente, se reemplaza 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.

Alternativamente, puede emplearse electroporación para introducir vectores que incorporan segmentos genómicos de influenza en células huésped. Por ejemplo, se introducen favorablemente vectores de plásmido que incorporan un virus influenza A o influenza B en células Vero usando electroporación según el siguiente procedimiento. En resumen, se resuspenden  $5 \times 10^6$  células Vero, por ejemplo, hechas crecer en medio de Eagle modificado (MEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% en 0,4 ml de OptiMEM y se colocan en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 µl a las células en la cubeta, que entonces se mezcla suavemente dando pequeños golpes. 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 una constante de tiempo de entre 28-33 ms. Las células se vuelven a mezclar dando pequeños golpes suavemente y aproximadamente 1-2 minutos tras la electroporación se añaden 0,7 ml de MEM con FBS al 10% directamente a la cubeta. Las células se transfieren entonces a dos pocillos de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos que contiene 2 ml de MEM, FBS al 10% u OPTI-MEM sin suero. La cubeta se lava para recuperar cualquier célula restante y la suspensión de lavado se divide entre los dos pocillos. El volumen final es de aproximadamente 3,5 ml. Las células se incuban entonces en condiciones permisivas para el crecimiento viral, por ejemplo, a aproximadamente 33°C para cepas adaptadas al frío.

#### Recuperación de virus

Normalmente se recuperan los virus del medio de cultivo en el que se han hecho crecer las células infectadas (transfectadas). Normalmente, se clarifica el medio de cultivo antes de la concentración de virus influenza. Los métodos comunes incluyen filtración, ultrafiltración, adsorción sobre sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, el medio en bruto de cultivos infectados puede clarificarse en primer lugar mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para eliminar residuos celulares y otra materia particulada

grande, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Alternativamente, el medio se filtra a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8  $\mu\text{m}$  para eliminar células intactas y otra materia particulada grande. Opcionalmente, el sobrenadante de medio clarificado se centrifuga entonces para sedimentar los virus influenza, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Tras la resuspensión del sedimento de virus en un tampón apropiado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, el virus se concentra mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre sacarosa (al 60%-12%) o tartrato de potasio (al 50%-10%). Son adecuados gradientes o bien continuos o bien escalonados, por ejemplo un gradiente de sacarosa entre el 12% y el 60% en cuatro etapas al 12%. Los gradientes se centrifugan a una velocidad, y durante un tiempo, suficiente para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación. Alternativamente, y para la mayoría de las aplicaciones comerciales a gran escala, el virus se somete a elutriación a partir de gradientes de densidad usando un rotor de centrifuga zonal que funciona en modo continuo. Se proporcionan detalles adicionales suficientes para guiar a un experto a través de la preparación de virus influenza a partir de cultivo de tejidos, 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 estadounidense 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.

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

Pueden administrarse virus recombinantes y reordenantes descritos en el presente documento de manera profiláctica en un portador o excipiente apropiado para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas de virus influenza. Normalmente, el portador o excipiente es un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución salina acuosa, soluciones salinas tamponadas acuosas, disoluciones de dextrosa acuosas, disoluciones de glicerol acuosas, etanol, líquido alantoico de huevos de gallina no infectados (es decir, líquido alantoico normal "LAN") o combinaciones de los mismos. La preparación de tales disoluciones que garantizan esterilidad, pH, isotonicidad y estabilidad se efectúa según protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un portador o excipiente para minimizar efectos alérgicos y otros efectos no deseables, y para adecuarse a la vía de administración particular, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

Generalmente, los virus influenza descritos en el presente documento se administran en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas de virus influenza. Preferiblemente, la administración de los virus influenza provoca una respuesta inmunitaria protectora. Los expertos en la técnica conocen dosificaciones y métodos para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra una o más cepas de influenza. Por ejemplo, se proporcionan virus influenza inactivados en el intervalo de aproximadamente 1-1000  $\text{HID}_{50}$  (dosis infectiva humana), es decir, aproximadamente  $10^5$ - $10^8$  ufp (unidades formadoras de placa) por dosis administrada. Alternativamente, se administran aproximadamente 10-50  $\mu\text{g}$ , por ejemplo, aproximadamente 15  $\mu\text{g}$  de HA sin adyuvante, administrándose dosis más pequeñas con adyuvante. Normalmente, la dosis se ajustará dentro de este intervalo basándose en, por ejemplo, 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 de manera sistémica, 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, o bien mediante gotas, aerosol de partículas grandes (mayores de aproximadamente 10 micrómetros) o bien pulverización en las vías respiratorias superiores. Aunque cualquiera de las vías de administración anteriores 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 administración intranasal, se prefieren a menudo vacunas de virus vivo atenuado, por ejemplo, un virus recombinante o reordenante atenuado, adaptado al frío y/o sensible a la temperatura. Aunque 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.

Alternativamente, puede estimularse una respuesta inmunitaria mediante selección como diana *ex vivo* o *in vivo* de células dendríticas con virus influenza. 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 convencionales.

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

Si se desea, la administración de vacunas profilácticas de virus influenza puede realizarse conjuntamente con la administración de una o más moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladora, inmunopotenciadora y

5 proinflamatoria, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de colonias (CSF) de granulocitos y macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmuestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que los virus influenza, o pueden administrarse por separado. Puede administrarse o bien la proteína o bien un vector de expresión que codifica para la proteína para producir un efecto inmunoestimulador.

10 Los vectores descritos en el presente documento que incluyen segmentos genómicos de influenza pueden emplearse para introducir ácidos nucleicos heterólogos en un organismo huésped o célula huésped, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, células derivadas de un sujeto humano, en combinación con un portador o excipiente farmacéutico adecuado tal como se describió anteriormente. Normalmente, el ácido nucleico heterólogo se inserta en una región no esencial de un gen o segmento génico, por ejemplo, el gen M del segmento 7. La secuencia de polinucleótido heteróloga puede codificar para un polipéptido o péptido, o un ARN tal como un ARN antisentido o ribozima. El ácido nucleico heterólogo se introduce entonces en un huésped o células huésped produciendo virus recombinantes que incorporan el ácido nucleico heterólogo, y los virus se administran tal como se describió anteriormente.

15 Alternativamente, puede introducirse un vector de la invención que incluye un ácido nucleico heterólogo y expresarse en células huésped cotransfectando el vector en una célula infectada con un virus influenza. Opcionalmente las células se devuelven o se suministran entonces al sujeto, normalmente al sitio del que se obtuvieron. En algunas aplicaciones, las células se injertan sobre un sitio de sistema, órgano o tejido (tal como se describió anteriormente) de interés, usando procedimientos de injerto o transferencia de células establecidos. Por ejemplo, puede suministrarse células madre del linaje hematopoyético, tales como células madre hematopoyéticas derivadas de sangre periférica, sangre de cordón o médula ósea a un sujeto usando técnicas de transfusión o suministro convencionales.

20 Alternativamente, los virus que comprenden un ácido nucleico heterólogo pueden suministrarse a las células de un sujeto *in vivo*. Normalmente, tales métodos implican la administración de partículas de vector a una población de células diana (por ejemplo, células sanguíneas, células cutáneas, células de hígado, células neurales (incluyendo cerebrales), células de riñón, células uterinas, células musculares, células intestinales, células cervicales, células vaginales, células de próstata, etc., así como células tumorales derivadas de una variedad de células, tejidos y/u órganos. La administración puede ser o bien sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa de partículas virales, o bien suministrando las partículas virales directamente a un sitio o sitios de interés mediante una variedad de métodos, incluyendo inyección (por ejemplo, usando una aguja o jeringuilla), suministro de vacunas sin aguja, administración tópica o empuje al interior de un sitio de tejido, órgano o piel. Por ejemplo, las partículas de vectores virales pueden suministrarse mediante inhalación, por vía oral, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía subdérmica, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, mediante administración vaginal o rectal, o colocando las partículas virales dentro de una cavidad u otro sitio del cuerpo, por ejemplo, durante cirugía.

25 Los métodos descritos anteriormente son útiles para tratar terapéutica y/o profilácticamente una enfermedad o trastorno introduciendo un vector de la invención que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica para un polipéptido (péptido) o ARN (por ejemplo, un ARN antisentido o ribozima) terapéutica o profilácticamente eficaz en una población de células diana *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Normalmente, el polinucleótido que codifica para el polipéptido (o péptido) o ARN de interés está operativamente unido a secuencias reguladoras apropiadas tal como se describió anteriormente en las secciones tituladas "Vectores de expresión" y "Elementos de expresión adicionales". Opcionalmente, se incorpora más de una secuencia codificante heteróloga en un virus o vector individual. Por ejemplo, además de un polinucleótido que codifica para un ARN o polipéptido terapéutica o profilácticamente activo, el vector también puede incluir polipéptidos terapéuticos o profilácticos adicionales, por ejemplo, antígenos, moléculas coestimuladoras, citocinas, anticuerpos, etc. y/o marcadores, similares.

30 Los métodos y vectores descritos en el presente documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente una amplia variedad de trastornos, incluyendo trastornos genéticos y adquiridos, por ejemplo, como vacunas para enfermedades infecciosas, debido a virus, bacterias, y similares.

## 50 Kits

Para facilitar el uso de los vectores y sistemas de vectores descritos en el presente documento, cualquiera de los vectores, por ejemplo, plásmidos de virus influenza consenso, plásmidos de polipéptidos de influenza variantes, plásmidos de bibliotecas de polipéptidos de influenza, etc., y componentes adicionales, tales como, tampón, células, medio de cultivo, útiles para el envasado y la infección de virus influenza para fines experimentales o terapéuticos, pueden envasarse en forma de un kit. Normalmente, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para realizar los métodos descritos en el presente documento, material de envasado y un recipiente.

Manipulación de ácidos nucleicos virales y proteínas



Se manipulan proteínas y/o ácidos nucleicos de virus influenza descritos en el presente documento según técnicas de biología molecular bien conocidas. Se describen protocolos detallados para numerosos procedimientos de este tipo, incluyendo amplificación, clonación, mutagénesis, transformación, y similares, por ejemplo, en Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (con suplementos hasta 2000) John Wiley & Sons, Nueva York ("Ausubel"); Sambrook *et al.* Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook"), y Berger y Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA ("Berger").

Además de las referencias anteriores, se encuentran protocolos para técnicas de amplificación *in vitro*, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de Q $\beta$ -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), útiles por ejemplo para amplificar sondas de ADNc de la invención, en Mullis *et al.* (1987) patente estadounidense n.º 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.* eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Arnheim y Levinson (1990) C&EN 36; The Journal OF NIH Research (1991) 3:81; Kwok *et al.* (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86, 1173; Guatelli *et al.* (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1874; Lomell *et al.* (1989) J Clin Chem 35:1826; Landegren *et al.* (1988) Science 241:1077; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560; Barringer *et al.* (1990) Gene 89:117, y Sookninan y Malek (1995) Biotechnology 13:563. Los métodos adicionales, útiles para clonar ácidos nucleicos en este contexto incluyen Wallace *et al.* patente estadounidense n.º 5.426.039. Se resumen métodos mejorados de amplificación de ácidos nucleicos grandes mediante PCR en Cheng *et al.* (1994) Nature 369:684 y las referencias en el mismo.

Determinados polinucleótidos de la invención, por ejemplo, oligonucleótidos, pueden sintetizarse utilizando diversas estrategias de fase sólida incluyendo química de acoplamiento de fosforamidita a base de trinucleótidos y/o mononucleótidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse secuencias de ácido nucleico mediante la adición secuencial de monómeros y/o trímeros activados a una cadena de polinucleótido en elongación. Véase por ejemplo, Caruthers, M.H. *et al.* (1992) Meth Enzymol 211:3.

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

Además, pueden lograrse sustituciones de residuos de aminoácido seleccionados en polipéptidos virales mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos virales con sustituciones de aminoácido funcionalmente correlacionadas con características fenotípicas deseables, por ejemplo, un fenotipo atenuado, adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, introduciendo mutaciones específicas en un segmento de ácido nucleico viral que codifica para el polipéptido. Se conocen bien en la técnica métodos para la mutagénesis dirigida al sitio, y se describen, por ejemplo, en Ausubel, Sambrook y Berger, citados anteriormente. Están disponibles comercialmente numerosos kits para realizar mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida al sitio Chameleon (Stratagene, La Jolla), y pueden usarse según las instrucciones de los fabricantes para introducir, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido descritas en la tabla 6 o la tabla 17, en un segmento genómico que codifica para un polipéptido de influenza A o B, respectivamente.

### Ejemplos

#### EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE pAD3000

Se modificó el plásmido pHW2000 (Hoffmann *et al.* (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids, Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113) para sustituir las señales de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH) con secuencias de señal de poliadenilación derivadas de virus del simio 40 (SV40).

Se amplificaron secuencias derivadas de SV40 con Taq MasterMix (Qiagen) usando los siguientes oligonucleótidos, designados en el sentido de 5' a 3': poliA.1: AACAAATTGAGATCTCGGTACCTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT (SEQ ID NO: 1) poliA.2: TATAACTGCAGACTAGTGATATCCTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTA (SEQ ID NO: 2).

Se usó el plásmido pSV2His como molde. Se obtuvo un fragmento que concordaba con el producto de 175 pb predicho y se clonó en pcDNA3.1, usando un vector de clonación Topo TA (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se escindió el fragmento de 138 pb deseado que contenía las señales de poliadenilación de SV40 a partir del plásmido resultante con EcoRV y BstEII, se aisló a partir de un gel de agarosa, y se ligó entre los sitios de PvuII y BstEII únicos en pHW2000 usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Ausubel, Berger, Sambrook). Se secuenció el plásmido resultante, pAD3000 (figura 1), y se encontró que contenía el sitio de poliadenilación de SV40 en la orientación correcta. Los nucleótidos 295-423 en pAD3000 corresponden a los nucleótidos 2466-2594, respectivamente, en cepa 777 de SV40 (AF332562).

#### EJEMPLO 2: SISTEMA DE OCHO PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE VDM-A

5 Se ha usado comúnmente una variante de cepa A/AA/6/60 de virus influenza tipo A adaptada al frío como virus donador maestro para la producción de vacunas de influenza A administradas por vía nasal. Esta cepa es un virus donador maestro (VDM) a modo de ejemplo en el contexto de la presente invención. Por simplicidad, esta variante de cepa A/AA/6/60 se denomina VDM-A en el presente documento. Se extrajo ARN viral de VDM-A usando el mini-kit RNeasy (Qiagen) y se amplificaron los ocho fragmentos de ADNc correspondientes mediante RT-PCR usando los cebadores indicados en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores usados para clonar ocho segmentos de VDM-A

SEQ ID NO	Cebador	Secuencia (5'-3')
CEBADORES DIRECTOS DE VDM-A		
3	Aarl PB2 largo	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC GAA AGC AGG TC
4	BsmBI-PB1	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC AAA
5	BsmBI-PA	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT ACT
6	BsmBI-NP	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TAG A
7	Aarl HA-largo	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC AAA AGC AGG GG
8	BsmBI-NA	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGA GTG A
9	BsmBI-M	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGT AGA T
10	BsmBI-NS	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TGA
CEBADORES INVERSOS DE VDM-A		
11	Aarl PB2-largo	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGT CGT TT
12	BsmBI-PB1	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
13	BsmBI-PA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
14	BsmBI-NP	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT
15	Aarl HA-largo	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGG TGT T
16	BsmBI-NA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAG TTT
17	BsmBI-M	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA GTT
18	BsmBI-NS	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT

10 Con la excepción de los segmentos del genoma de influenza que codifican para HA y PB2, que se amplificaron usando los cebadores que contenían el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Aar I, los 6 genes restantes se amplificaron con cebadores que contenían el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BsmB I. Se clonaron fragmentos de ADNc tanto de Aarl como de BsmB I entre los dos sitios de BsmB I del vector pAD3000.

15 El análisis de secuenciación reveló que todos los fragmentos de ADNc clonados contenían mutaciones con respecto a la secuencia de VDM-A consenso, que probablemente se introdujeron durante las etapas de clonación. Las mutaciones encontradas en cada segmento génico se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Mutaciones introducidas en los clones de VDM-A en pAD3000

Segmento génico	Posiciones de la mutación (nt)	Cambios de aminoácido
PB2	A954(G/C/T), G1066A, T1580C, T1821C	silencioso, de Gly a Ser, de Val a Ala, silencioso
PB1	C1117T	de Arg a terminación
PA	G742A, A1163G, A1615G, T1748C, C2229del	de Gly a Ser, de Asp a Gly, de Arg a Gly, de Met a Thr, no codificante
HA	A902C, C1493T	de Asn a His, de Cys a Arg
NP	C113A, T1008C	de Thr a Asn, silencioso
NA	C1422T	de Pro a Leu
M	A191G	de Thr a Ala
NS	C38T	silencioso

Se corrigieron todas las mutaciones de vuelta a la secuencia de VDM-A consenso usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) y cebadores oligonucleotídicos sintéticos tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores usados para corregir las mutaciones en los clones de VDM-A

	HJ67	PB2A954G	5/P/gcaagctgtggaatatgcaaggc (SEQ ID NO: 19)
	HJ68	PB2A954G.as	gccttgcataattccacagctgc (SEQ ID NO: 20)
	HJ69	PB2G1066A	5/P/gaagtgtctacgggcaatctcaaac (SEQ ID NO: 21)
PB2	HJ70	PB2G1066A.as	gtttgaagattgcccgttaagcacttc (SEQ ID NO: 22)
	HJ71	PB2T1580A	5/P/cctgaggaggtcagtgaaacac (SEQ ID NO: 23)
	HJ72	PB2T1580A.as	gttttactgacctcctcagg (SEQ ID NO: 24)
	HJ73	PB21821C	5/P/gttgttaggactctattccaac (SEQ ID NO: 25)
	HJ74	PB21821C.as	gttgaatagagtctaacaacac (SEQ ID NO: 26)

PB1	HJ75	PB1C1117T	gacagtaagctccgaacacaaatac (SEQ ID NO: 27)
	HJ76	PB1C1117T.as	gtatttggttcggagcttcatgc (SEQ ID NO: 28)
	HJ77	PA-G742A	5/P/cgaaccgaacggctacattgaggg (SEQ ID NO: 29)
	HJ78	PA-G742A.as	ccctcaatgtagccgttcggttcg (SEQ ID NO: 30)
	HJ79	PA-A1163G	5/P/cagagaaggttagattgacgactg (SEQ ID NO: 31)
	HJ80	PA-A1163G.as	cagtcgcaaaagtctaccttctctg (SEQ ID NO: 32)
PA	HJ81	PA-A1615G	5/P/cactgaccaagacttgagccac (SEQ ID NO: 33)
	HJ82	PA-A1615G.as	gtggctcaagcttgggtcagtg (SEQ ID NO: 34)
	HJ83	PA-T1748C	5/P/caaagattaaaatgaatggggaatg (SEQ ID NO: 35)
	HJ84	PA-T1748C.as	cattccccatttcatttaactcttg (SEQ ID NO: 36)
	HJ85	PA-C2229	5/P/gtacctgtttctactaataaccgg (SEQ ID NO: 37)
	HJ86	PA-C2230.as	ccgggttattagtagaacaaggtag (SEQ ID NO: 38)
	HJ87	HA-A902C	5/P/ggaacacttgagaactgtgagacc (SEQ ID NO: 39)
HA	HJ88	HA-A902C.as	ggtctcacagtctcaagtgtcc (SEQ ID NO: 40)
	HJ89	HA-C1493T	5/P/gaattttatcacaaatgtgatgatgaatg (SEQ ID NO: 41)
	HJ90	HA-C1493T.as	cattcatcatcacattgtgataaaattc (SEQ ID NO: 42)
	HJ91	NP-C113A	5/P/gccagaatgcaactgaaatcagagc (SEQ ID NO: 43)
NP	HJ92	NP-C113A.as	gctctgatttcagttcattctggc (SEQ ID NO: 44)
	HJ93	NP-T1008C	5/P/ccgaatgagaatccagcacacaag (SEQ ID NO: 45)
	HJ94	NP-T1008C.as	ctgtgtgctggattctcattcgg (SEQ ID NO: 46)
	HJ95	NA-C1422T	catcaatttcagcctataaagcttc (SEQ ID NO: 47)
NS	HJ96	NA-C1422T.as	gaaagcttatatagcatgaaattgatg (SEQ ID NO: 48)
	HJ97	NS-C38T	cataatggatcctaactgtgtcaagc (SEQ ID NO: 49)
	HJ98	NS-C38T.as	gcttgacacagtgtaggatccattatg (SEQ ID NO: 50)
PA	HJ99	PA6C375T	ggagaatagattcatcgagattggag (SEQ ID NO: 51)
	HJ100	PA6C375T.as	ctcaatctcgatgaatctattctcc (SEQ ID NO: 52)

### EJEMPLO 3: GENERACIÓN DE VDM-A RECOMBINANTE INFECCIOSO Y VIRUS INFLUENZA REORDENADO

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

#### Expresión funcional de proteínas de polimerasa de VDM-A

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

Se transfectaron las PB1, PB2, PA y NP o PB1, PA, NP de VDM-A (-PB2 como control negativo) en las células MDCK/293T cultivadas conjuntamente junto con un plásmido que representaba un minigenoma de EGFP de virus influenza A (pHW72-EGFP) (Hoffmann *et al.* (2000) "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template, *Virology* 15:267(2):310-7). Se observaron las células transfectadas

con microscopio de contraste de fase o microscopio de fluorescencia a las 48 horas tras la transfección. Alternativamente, puede emplearse citometría de flujo para detectar la expresión de EGFP.

5 Tal como se muestra en la figura 2, se observó fluorescencia verde, que indica expresión del minigenoma de EGFP, en las células transfectadas con PB2, PB 1, PA y NP de VDM-A, pero no en las células transfectadas sólo con tres proteínas de polimerasa. Esto indicó que las proteínas de polimerasa de VDM-A en pAD3000 eran funcionales.

En otros ensayos se usa un minigenoma que incluye el gen de cloranfenicol acetil transferasa (CAT), denominado pFlu-CAT, para medir la actividad polimerasa. En un ensayo de este tipo, se mide la expresión de CAT a nivel de proteína (por ejemplo, mediante ELISA) o de ARN, como indicador de la replicación del minigenoma.

Análisis de los plásmidos de VDM-A mediante experimento de únicos reordenamientos génicos

10 Se mostró que cada uno de los 8 segmentos de genoma de VDM-A clonados en pAD3000 se expresaba funcionalmente en un experimento de reordenamiento transfectando conjuntamente un único segmento génico de MDA-A junto con los siete fragmentos complementarios de la cepa A/PR/8/34 de control. Los ocho plásmidos de segmentos de genoma individuales en combinación con segmentos de control complementarios generaron virus reordenante infeccioso, que provocó efectos citopáticos en células MDCK infectadas, lo que indica que los ocho plásmidos codifican para proteínas de VDM-A funcionales. Tabla 4.

Tabla 4. Recuperación de reordenantes 7+1 mediante plásmidos

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

20 Para determinar adicionalmente las limitaciones de empaquetamiento de virus influenza A, se separó el segmento NS en dos segmentos génicos separados: uno que codificaba para el segmento genómico NS1 y el otro que codificaba para el segmento genómico NS2. Se transfectaron los nueve plásmidos que incorporaban los segmentos genómicos de influenza A en células MDCK/COS tal como se describió anteriormente, y se amplificaron los virus recuperados en huevos de gallina embrionados antes de la titulación en células MDCK. Se observó un tamaño de placa de lisis reducido para el sistema de nueve plásmidos en comparación con el sistema de ocho plásmidos descrito anteriormente. El análisis de RT-PCR demostró que sólo el segmento NS2 estaba presente en los viriones, y que el segmento génico de NS1 no estaba empaquetado.

25 Recuperación de VDM-A y virus reordenantes 6:2

30 Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, tres días tras la transfección o bien con los 8 plásmidos de VDM-A (recombinante), o bien con plásmidos que incorporaban los 6 genes internos de VDM-A, y HA y NA derivadas de A/PR/8/34 (reordenante 6:2), se usaron sobrenadantes de cultivo transfectados para infectar células MDCK recientes, y se incubaron las células infectadas a 33°C durante tres días en presencia de TPCK-tripsina 1 µg/ml. Se observó el efecto citoplasmático de virus recombinante sobre células MDCK infectadas usando un microscopio. Se monitorizó la expresión de hemaglutinina viral usando un ensayo de hemaglutinación convencional (HA). Se realizaron ensayos de HA mezclando 50 µl de sobrenadantes de cultivo diluidos 2 veces en serie con 50 µl glóbulos rojos de pollo al 1% en placas de 96 pocillos. Se detectó un título de HA de aproximadamente 1:254-1:1024 para los virus amplificados derivados o bien de los 8 plásmidos de VDM-A transfectados o bien de virus reordenante 6:2. Se usó la reacción de transfección usando los 8 plásmidos de A/PR/8/34 obtenidos del Dr. E. Hoffman como control positivo. Se produjeron virus influenza infecciosos a partir de estas tres reacciones de transfección tal como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos usados para la recuperación de A/PR/8/34, VDM-A y reordenante 6:2

Segmento génico de virus	A/PR/8/34 (H1N1)	VDMr-A (H2N2)	reordenante 6:2
1	pHW191-PB2 (AD731)	pMDV-A-PB2#2 (AD760)	pMDV-A-PB2#2 (AD760)
2	pHW192-PB1 (AD732)	pMDV-A-PB1 (AD754)	pMDV-A-PB1 (AD754)
3	pHW193-PA (AD733)	pMDV-A-PA (AD755)	pMDV-A-PA (AD755)
4	pHW195-NP (AD735)	pMDV-A-NP#1 (AD757)	pMDV-A-NP#1 (AD757)
5	pHW197-M (AD737)	pMDV-A-M (AD752)	pMDV-A-M (AD752)
6	pHW198-NS (AD738)	pMDV-A-NS (AD750)	pMDV-A-NS (AD750)
7	pHW194-HA (AD734)	pMDV-A-HA (AD756)	pHW194-HA (AD734)
8	pHW-196-NA (AD735)	pMDV-A-NA#4 (AD759)	pHW196-NA (AD736)
CPE	+	+	+

Se realizó RT-PCR para mapear los genotipos de los virus recuperados. Se aisló ARN viral del sobrenadante de cultivo celular infectado usando el mini-kit RNeasy (Qiagen) y se amplificaron los ocho segmentos de virus influenza mediante RT-PCR usando cebadores específicos para cada segmento génico de VDM-A y cebadores específicos de H1 y de N1. Tal como se muestra en la figura 3, VDMr-A contenía PB2, PB1, NP, PA, M y NS que eran específicas para VDM-A y HA y NA específicas para el subtipo H2 y N2. El reordenante 6:2 contenía los 6 genes internos derivados de VDM-A, y las HA y NA derivadas de A/PR/8/34 (H1N1). Esto confirmó que virus generados a partir de los plásmidos transfectados tenían los genotipos correctos.

Se titularon los virus rescatados mediante ensayo en placa de lisis con células MDCK y se confirmó que las placas de lisis eran virus influenza mediante inmunotinción usando suero de pollo preparado contra VDM-A. Se infectaron células MDCK con una confluencia del 100% en placas de 12 pocillos con 100  $\mu$ l de virus diluido en serie 10 veces a TA durante 1 hora con balanceo suave. Se retiró el inóculo y se recubrieron las células con 1X L15 que contenía el 0,8% de agarosa y TPCK-tripsina 1 mg/ml. Se incubaron las placas a 35°C o 33°C durante tres días, se fijaron con metanol al 100%, se bloquearon con el 5% de leche en PBS, y se incubaron con antisuero de pollo anti-VDM-A diluido 1:2000 durante 1 hora seguido por incubación con anticuerpo de conejo anti-IgG de pollo conjugado con HRP durante 1 h. Se visualizaron las placas de lisis mediante adición de la disolución de sustrato de HRP (DAKO). Todos los virus recuperados mostraron inmunotinción positiva.

#### EJEMPLO 4: MAPEO DE LAS BASES GENÉTICAS DE LOS FENOTIPOS CA, TS, ATT DE VDM-A

La cepa de vacuna de virus influenza VDM-A tiene varios fenotipos relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas: adaptación al frío (ca), sensibilidad a la temperatura (ts) y atenuación (att). La comparación de secuencias de la cepa de VDM-A con la cepa A/AA/6/60 wt virulenta no ts reveló un mínimo de 17 diferencias de nt entre estas dos cepas (tabla 6). Varios de los cambios en la secuencia de VDM-A son únicos para esta cepa en comparación con todos los virus influenza tipo A disponibles en la base de datos GeneBank, lo que sugiere que una o más de estas sustituciones de aminoácido está funcionalmente relacionada con el/los fenotipo(s) att, ca y ts. El cambio de un único aminoácido en PB2<sup>621</sup> era la única posición de nucleótido que se había notificado anteriormente como determinante en el fenotipo ts de VDM-A (Subbarao *et al.* (1995) Addition of Temperature-Sensitive Missense Mutations into the PB2 Gene of Influenza A Transfectant Viruses Can Effect an Increase in Temperature Sensitivity and Attenuation and Permits the Rational Design of a Genetically Engineered Live Influenza A Virus Vaccine, *J. Virol.* 69:5969-5977).

Con el fin de precisar las sustituciones mínimas implicadas en los fenotipos de VDM-A, se cambiaron individualmente los nucleótidos en el clon de VDM-A que se diferencian de A/AA/6/60 wt por los de A/AA/6/60 wt (es decir, "se reversionaron"). Entonces se introdujo cada segmento génico revertido en células huésped en combinación con segmentos complementarios de VDM-A para recuperar los únicos reordenantes génicos. Además, también pueden transfectarse el segmento génico revertido y el segmento de VDM-A correspondiente en combinación con segmentos derivados de otras cepas de tipo natural, por ejemplo, cepa A/PR/8/34, para evaluar la contribución de cada segmento génico a los fenotipos de virus. Usando el sistema de plásmido de VDM-A recombinante descrito anteriormente, se realizó mutagénesis dirigida al sitio para modificar adicionalmente los seis genes internos para producir un reordenante no ts. Se introdujo un total de 15 mutaciones de sustitución de nucleótidos en los seis plásmidos de VDM-A para representar el genoma de A/AA/6/60 de tipo natural recombinante (rWt, Flu064) tal como se indica en la tabla 6. Se mantuvieron células de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) y células COS-7 y se transfectaron tal como se describió anteriormente. Entonces se sometieron los virus recuperados a pases en células MDCK una vez, seguido por amplificación en las cavidades alantoideas de huevos de gallina embrionarios. Se realizaron la transfección y el crecimiento de virus en MDCK y huevos a 33°C, a temperatura permisiva para virus tanto ca como wt para minimizar cualquier presión de selección por la temperatura. Se confirmó el genotipo de virus mediante análisis de secuencia de fragmentos de ADNc amplificados a partir de ARN viral.

Tabla 6. Comparaciones de secuencias de A/AA/6/60 "wt" y VDM-A

Segmento de ARN	Posición de base (aminoácido)	E10SE2	VDM-A	rWT (Flu044)
PB2	<b>141</b>	A	G	A

	<b>821 (265)</b>	A (Asn)	G(Ser)	A
	1182	A	T	T
	1212	C	T	T
	<b>1933</b>	T	C	T
PB1	123	A	G	G
	<b>1195 (391)</b>	A (Lys)	G (Glu)	A
	<b>1395 (457)</b>	G (Glu)	T (Asp)	G
	<b>1766 (581)</b>	A (Glu)	G (Gly)	A
	<b>2005 (661)</b>	G (Ala)	A (Thr)	A
	<b>2019</b>	C	T	C
PA	<b>20</b>	T	C	T
	<b>1861 (613)</b>	A (Lys)	G (Glu)	G
	<b>2167/8 (715)</b>	TT (Leu)	CC (Pro)	TT
NP	<b>146 (34)</b>	A (Asp)	G (Gly)	G
	<b>1550</b>	'5A'	'6A'	'6A'
M	<b>969 (M2-86)</b>	G (Ala)	T (Ser)	G
NS	<b>483 (NS1-153)</b>	G (Ala)	A (Thr)	G

Los números en negrita representan las diferencias entre VDMr-A y rWt.  
Las palabras en negrita (15) son los cambios entre VDMr-a y rwt.

Se determinaron características fenotípicas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describió anteriormente en la patente estadounidense 6.322.967 concedida a Parkin titulada "Recombinant tryptophan mutants of influenza", que se incorpora en el presente documento en su totalidad. En resumen, se determinó la sensibilidad a la temperatura de los virus recombinantes mediante ensayo en placa de lisis con células MDCK a 33, 38 y 39°C. Se infectaron células MDCK en placas de 6 pocillos con 400 µl de virus diluido en serie 10 veces y se adsorbieron a temperatura ambiente durante 60 min. Se retiraron los inoculantes y se sustituyeron por 1x L15/MEM que contenía el 1% de agarosa y TPCK-tripsina 1 µg/ml. Se incubaron las células infectadas a 33°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> o en recipientes estancos al agua que contenía el 5% de CO<sub>2</sub> sumergidos en baños de agua circulante mantenidos a 38 ± 0,1°C o 39 ± 0,1°C (Parkin *et al.* (1996) Temperature sensitive mutants of influenza A virus generated by reverse genetics and clustered charged to alanine mutagenesis. *Vir. Res.* 46:31-44). Tras una incubación de tres días se inmunotifieron las monocapas usando anticuerpos policlonales de pollo anti-VDM y se numeraron las placas de lisis. Se compararon recuentos de placas de lisis obtenidos a cada una de las temperaturas para evaluar el fenotipo ts de cada virus y cada ensayo se realizó un mínimo de tres veces. Se definió la temperatura de desactivación como la menor temperatura que tenía una reducción del título de 100 veces o superior en comparación con 33°C.

Se amplificó virus infeccioso obtenido de las células COS-7/MDCK cultivadas conjuntamente transfectadas con los ocho plásmidos (pMDVPB2, pMDV-PB1, pMDV-PA, pMDV-NP, pMDV-HA, pMDV-NA, pMDV-M y pMDV-NS) en huevos embrionados de gallina, y se mostró que presentaba el fenotipo ts característico de VDM-A derivado biológico, no recombinante (tabla 7). Ni VDM-A ni VDMr-A formaron placas de lisis diferenciadas a 39°C, aunque ambos formaron placas de lisis fácilmente visualizadas a 33°C.

Tabla 7. Replicación de reordenantes de VDM/Wt a diversas temperaturas

Virus con genes Wt	33°C	38°C	33°C/38°C	39°C	33°C/39°C
VDM	8,91	6,10	2,82	<4,0 <sup>†</sup>	>4,91
VDMr-A	8,72	6,19	2,53	<4,0	>4,72
Wt (E10SE2)	8,86	8,87	-0,01	8,87	-0,01
rWT (Flu064)	9,02	9,07	-0,05	8,96	0,06
Wt-PB2	8,46	7,87	0,59	5,80*	2,66
Wt-PB1	8,92	8,74	0,18	7,86*	1,06
Wt-NP	8,40	7,24	1,15	<4,0	>4,40
Wt-PA	8,57	6,10	2,48	<4,0	>4,57
Wt-M	8,80	6,68	2,12	<4,0	>4,80
Wt-NS	8,72	6,10	2,62	<4,0	>4,72
Wt-PB1/PB2	8,94	8,89	0,05	8,10*	0,85
Wt-PB1/PB2/NP	8,52	8,38	0,14	8,41	0,1

\* Indica reducción del tamaño de placa de lisis en comparación con rWt.

<sup>†</sup> El subrayado indica que no se detectaron placas de lisis a una dilución de 10<sup>-4</sup> veces

Con el fin de realizar un análisis detallado, sistemático, de la base genética del fenotipo ts de VDM-A, se usaron las secuencias de varias cepas de A/AA/6/60 wt, no att, no ts, estrechamente relacionadas, con 17-48 diferencias de nt con respecto a A/AA/ 6/60 ca, incluyendo el aislado altamente relacionado, E10SE2 de A/AA/6/60 wt, para

comparación. Existe un total de 19 diferencias de nt entre E10SE2 y VDM-A (tabla 6). Se mostró que E10SE2 no era ts (tabla 7) y no era att en hurones. Con el fin de generar un virus recombinante no ts, se alteraron los plásmidos de VDM-A mediante mutagénesis dirigida al sitio para incorporar 15 de las 19 diferencias representando 10 cambios de aminoácido. Cuatro de las posiciones de nucleótido, PB2-1182, 1212, PB1-123 y NP-1550, que se diferenciaban entre VDM-A y E10SE2, no se alteraron con respecto a la secuencia de VDM-A, ya que estos nucleótidos se observaron en otros aislados no ts de A/AA/6/60 y, por tanto, no se esperaba que tuvieran un papel en la expresión del fenotipo ts (Herlocher *et al.* (1996) Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. *Virus Research* 42:11-25). Se obtuvo virus recombinante (rWt, Flu064), que codificaba para los 15 cambios de nucleótido, a partir de las células COS-7 / MDCK cultivadas conjuntamente, transfectadas con un conjunto de 8 plásmidos, pWt- PB2, pWt-PB1, pWt-PA, pWt-NP, pWt-M, pWt-NS, pMDV-HA y pMDV-NA. El análisis de secuenciación indicó que rWt contenía los cambios genéticos designados y no era ts a 39°C, de manera idéntica a A/AA/6/60 wt derivado de manera biológica. Estas observaciones demostraron que el fenotipo ts se mapeaba en un subconjunto de estos 15 cambios de nt.

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

Se evaluó el efecto de cada segmento génico wt sobre el fenotipo ts de VDM-A creando únicos reordenantes génicos recombinantes (tabla 7). La introducción de PB2 wt en VDMr-A dio como resultado un virus que no era ts tan sólo a 38°C; sin embargo, seguía siendo ts a 39°C. La reducción del título de virus a 38°C y 39°C (con respecto a 33°C) fue de 0,6 log<sub>10</sub> y de 2,7 log<sub>10</sub>, respectivamente, según se mide mediante ensayo de placa de lisis en células MDCK. El reordenante que contenía el segmento génico de PB1 wt no era ts, con respecto a su capacidad para formar placas de lisis tanto a 38 como a 39°C. Sin embargo, el tamaño de placa de lisis de este recombinante se vio influido por un aumento de la temperatura y se redujo significativamente a 39°C en comparación con rWt. La introducción del segmento génico de NP wt en VDMr-A dio como resultado un virus que tampoco era ts a 38°C, pero al contrario que el recombinante de PB2 wt, el virus que contenía el segmento génico de NP wt no formó placas de lisis a 39°C. La introducción de segmentos génicos de PA, M o NS wt independientemente en VDMr-A no alteró el fenotipo ts, lo que indica que estos tres segmentos génicos tenían un papel mínimo en el mantenimiento de este fenotipo.

Dado que ninguno de PB1 wt, PB2 wt o NP wt expresadas individualmente en el VDM-A antecedente podían crear una eficacia de placa de lisis y perfil de tamaño de placas de lisis idénticos a rWt no ts, se introdujeron estos segmentos génicos en VDM-A en diversas combinaciones. La combinación de PB1 wt y PB2 wt dio como resultado un virus que no era ts tanto a 38 como a 39°C (tabla 7). Aunque el tamaño de placa de lisis fue algo mayor al de cualquier único reordenante génico, fue significativamente menor que rWt. La triple combinación de PB1/PB2/NP wt en VDMr-A dio como resultado un virus que era similar o idéntico a rWt en cuanto a su eficacia de formación de placas de lisis y tamaño de placa de lisis a 39°C. Por tanto, mientras que los segmentos génicos de PB2, PB1 y NP wt sólo revirtieron parcialmente el fenotipo ts cuando se introdujeron individualmente, la combinación de los tres segmentos génicos wt pudo revertir completamente el fenotipo ts a un comportamiento no ts idéntico a rWt.

Con el fin de determinar si estos 3 segmentos génicos podían conferir el fenotipo ts de VDM-A característico a rWt, se introdujeron los seis segmentos génicos internos derivados de VDM-A en rWt individualmente o en combinación. La introducción de un segmento génico de PB1, PB2 o NP individual en rWt dio como resultado una reducción del título de virus a 38°C y una mayor reducción a 39°C, sin embargo, ninguno de estos únicos reordenantes génicos estaba tan restringido a alta temperatura como VDMr-A (figura 10). Los segmentos génicos de PA, M y NS derivados de VDM-A no influyeron en el fenotipo no ts de rWt. De manera coherente con los reordenamientos anteriores, se demostró que la introducción de los genes tanto de PB1 como de PB2 de VDM-A en la estructura principal de rWt aumentó enormemente el fenotipo ts de virus a 38°C; sin embargo, la reversión completa del fenotipo ts de virus requirió la adición del gen de NP. Por tanto, los segmentos génicos de PB1, PB2 y NP derivados de VDM-A eran importantes para conferir el fenotipo ts completo.

#### Mapeo de los loci genéticos que determinan el fenotipo ts de VDM-A.

Se trataron sistemáticamente las diferencias específicas entre los segmentos génicos de PB1, PB2 y NP de rWt y VDMr-A para identificar los cambios que desempeñaban un papel significativo en el fenotipo ts. El gen de NP de VDMr-A sólo se diferenciaba de NP de rWt en el nt 146 (G34D, tabla 6). El gen de PB2 de VDMr-A se diferenciaba de rWt en tres sitios, pero sólo el nt 821 dio como resultado un cambio de aminoácido (N265S, tabla 6) y supuestamente representaba el locus ts ubicado en el segmento génico de PB2. El gen de PB1 de VDM-A se diferenciaba de PB1 wt en 6 posiciones de nt, de las cuales 4 eran cambios codificantes (tabla 6). Cada una de las sustituciones de residuos de aminoácido wt se sustituyó individualmente en el segmento génico de PB1 de VDMr-A para evaluar su papel en el fenotipo ts. 1395G (Glu-457) y 2005G (Ala) no afectaron al fenotipo ts de VDM-A. 1195A (Lys-391) y 1766A (Glu-581) dieron cada una como resultado una ligera reducción en el fenotipo ts a 38°C, pero no tuvieron ningún efecto a 39°C (tabla 8). Estos datos indicaron que 1195A y 1766A eran probablemente loci de ts en el segmento génico de PB1. Sin embargo, la combinación tanto de 1195A como de 1766A no produjo un fenotipo ts similar a PB1 wt (tabla 6). La adición de 2005G pero no de 1395A a PB1-1195A/1766A redujo adicionalmente el fenotipo ts de virus a 39°C, demostrando que 2005A también tenía un papel en la expresión del fenotipo ts especificado por el segmento de PB1 de VDM-A.

Tabla 8: Mapeo de los residuos en PB1 que determinan el fenotipo ts

Virus con secuencia Wt	33°C	38°C	33°C/38°C log <sub>10</sub> UFP/ml	39°C	33°C/39°C
VDMr-A	8,67	6,00	2,67	<4,0 <sup>†</sup>	>4,67
rWt	9,04	9,01	0,03	9,03	0,01
PB1-1195A	8,06	6,68	1,38	<4,0	>4,06
PB1-1395G	8,72	5,88	2,85	<4,0	>4,72
PB1-1766A	8,07	6,70	1,37	<4,0	>4,07
PB1-2005G	8,76	6,31	2,45	<4,0	>4,76
PB1-1195A1766A	8,65	7,60	1,05	5,98*	2,68
PB1-1195A1395G1766A	8,84	8,13	0,71	6,38*	2,46
PB1-1195A1766A2005G	8,79	8,12	0,66	7,14*	1,64
PB1/PB2/NP	8,26	8,63	0,12	8,59	0,16
PB2/NP	8,81	8,21	0,59	7,56*	1,25
PB1-1195A/PB2/NP	8,86	8,81	0,05	7,60*	1,26
PB1-1766A/PB2/NP	9,33	8,84	0,50	8,71*	0,62
PB1-1766A2005G/PB2/NP	8,30	8,22	0,08	8,11*	0,18
PB1-1766A1395G/PB2/NP	8,88	8,85	0,03	8,39*	0,49
PB1-1195A1766A/PB2/NP	8,45	8,48	0,06	8,10	0,35

\* Indica reducción del tamaño de placa de lisis en comparación con rWt.

† El subrayado indica que no se detectaron placas de lisis a una dilución de 10<sup>-4</sup> veces.

Entonces se introdujeron mutaciones de sitio individuales de PB1 junto con PB2 wt y NP wt en VDMr-A. Los reordenantes PB2/NP Wt y VDMr-A no eran ts a 38°C y tenían una reducción del título de 1,25 log<sub>10</sub> a 39°C, pero su tamaño de placa de lisis era mucho más reducido en comparación con rWt. La adición o bien de PB1-1195A o bien de 1766A no cambió significativamente el fenotipo del reordenante PB2/NP wt. Sólo la combinación de PB1-1195A y 1766A, junto con un PB2 wt y NP wt, dio como resultado un virus que tenía el mismo fenotipo no ts que el reordenante PB1/PB2/NP wt y VDMr-A (tabla 8). La adición de PB1-1395G o 2005G a PB1-1766/PB2/NP wt no convirtió el virus a un fenotipo no ts de rWt característico. Por tanto, estos datos demostraron que los cuatro aminoácidos distribuidos en los tres genes de PB1, PB2 y NP podían revertir completamente el fenotipo ts VDM-A.

Restricción de células huésped de VDM-A y virus reordenantes

Además de los fenotipos de sensibilidad a la temperatura y atenuación mostrados por los VDM-A y virus reordenantes con uno o más segmentos derivados de VDM-A tal como se describió anteriormente, los virus VDM-A mostraron restricción de células huésped tal como se indica por un crecimiento reducido en células Per.C6 con respecto al crecimiento en células MDCK. VDM-A y virus reordenantes con VDM-A derivados de segmentos de PB1 y PB2 mostraron un crecimiento significativamente reducido en células Per.C6 con respecto a su crecimiento en células MDCK, tal como se muestra en las figuras 20A y B.

Diseño por ingeniería genética de una cepa de virus atenuada, sensible a la temperatura

Para determinar si los cinco aminoácidos identificados en los segmentos génicos de PB1, PB2 y NP de VDM-A reproducirían los fenotipos ts y att de VDM-A, se introdujeron PB1-391E, 581G, 661T, PB2-265S, NP-34G en una cepa de virus de tipo natural divergente (A/PR/8/34; "PR8"), y el virus resultante mostró una reducción de 1,9 log<sub>10</sub> del título de virus a 38°C y una reducción de 4,6 log<sub>10</sub> a 39°C, lo que era muy similar a la de VDMr-A (figura 11).

La comparación de secuencias entre los genes de PB1, PB2 y NP de A/AA/6/60 ca (VDM-A) y A/PR/8/34 reveló que los cuatro aminoácidos sustituidos identificados en los genes de PB1 y PB2 de VDM-A son únicos. NP<sup>34</sup> se conserva entre VDM-A y PR8. Por tanto, se introdujeron los tres sitios ts, PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G) y PB1<sup>661</sup> (A661T), identificados en el gen de PB1 de VDM-A, en PB1 de A/PR/8/34 y se introdujo PB2<sup>265</sup> (N265S) en PB2 de A/PR/8/34 mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se verificaron las mutaciones introducidas en los genes de PB1 y PB2 mediante análisis de secuenciación. Los pares de cebadores usados para la reacción de mutagénesis se indican en la tabla 9. Estos virus se muestran esquemáticamente en la figura 16.

Tabla 9. Cebadores usados para introducir mutaciones ts en los genes de PB1 y PB2 de PR8

HJ240	PR8-PB1 A1195G	5' GAAAGAAGATTGAAGAAATCCGACCGCTC (SEQ ID NO: 79)
HJ241	PR8-PB1A1195G.as	5'GAGCGGTCGGATTTCTTCAATCTTCTTTC (SEQ ID NO: 80)
HJ242	PR8-PB1A1766G	5' GAAATAAAGAAACTGTGGGGCAAACCCGTTCC (SEQ ID NO: 81)
HJ243	PR8-PB1A1766G.as	5' GGAACGGGTTTGCCCCACAGTTTCTTTATTTTC (SEQ ID NO: 82)
HJ244	PR8-PB1G2005A	5' GTATGATGCTGTTACAACAACACTC (SEQ ID NO: 83)
HJ245	PR8-PB1G2005A.as	5' GGAGTGTGTTGTTGTAACAGCATCATAC (SEQ ID NO: 84)
HJ246	PR8-PB2A821G	5' ATTGCTGCTAGGAGCATAGTGAGAAGAGC (SEQ ID NO: 85)
HJ247	PR8-PB2A821G.as	5' GCTCTTCTCACTATGCTCCTAGCAGCAAT (SEQ ID NO: 86)

Para examinar si las mutaciones ts introducidas en los genes de PB1 y PB2 de PR8 confieren el fenotipo ts *in vitro*,



se realizó un ensayo de minigenoma. El indicador de minigenoma de influenza, denominado pFlu-CAT, contenía el gen de CAT de sentido negativo clonado bajo el control del promotor pol I. La expresión de la proteína CAT depende de la expresión de las proteínas PB1, PB2, PA y NP de influenza.

5 En resumen, se transfectaron células HEp-2 con 1 µg de cada uno de PB 1, PB2, PA, NP y minigenoma de pFlu-CAT mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Tras una incubación durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 33°C o 39°C, se analizaron los extractos celulares para determinar la expresión de proteína CAT mediante el kit CAT ELISA (Roche Bioscience). Se midió el nivel de ARNm de CAT mediante ensayo de extensión de cebadores. A las 48 h tras la transfección, se extrajo ARN celular total mediante reactivo TRIzol (Invitrogen) y se mezcló 1/3 del ARN con un exceso de cebador de ADN (5'-ATGTTCTTTACGATGCGATTGGG (SEQ ID NO: 89)) marcado en su extremo 5' con [<sup>32</sup>P]-ATP y polinucleótido cinasa de T4 en 6 µl de agua. Tras desnaturalizar a 95°C durante 3 min., se realizó la extensión de cebadores tras la adición de 50 U de transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen) en el tampón de reacción proporcionado con la enzima que contenía dNTP 0,5 mM durante 1 h a 42°C. Se analizaron los productos de transcripción en geles de poliacrilamida al 6% que contenían urea 8 M en tampón TBE y se detectaron mediante autoradiografía.

15 Tal como se muestra en las figuras 12A y B, el gen de PB que lleva las tres sustituciones de aminoácido (PR8-3s), PB1<sup>391</sup> (K391E), PB1<sup>581</sup> (E581G) y PB1<sup>661</sup> (A661T), tenía actividad reducida a 33°C en comparación con control de PR8. Se observó una mayor reducción de la expresión de proteína CAT (figura 12A) para este mutante a 39°C, lo que indica que el gen de PB1 con los tres sitios ts de VDM-A introducidos mostraba replicación sensible a la temperatura en este ensayo *in vitro*. La introducción de PB2<sup>265</sup> (N265S) en PR8 tenía muy poco efecto sobre su actividad a temperaturas tanto permisiva (33°C) como no permisiva (39°C). La combinación tanto de PB1-3s como de PB2-1s dio como resultado una mayor reducción de la actividad de proteína (PR8-4s), que pareció ser incluso más ts que VDM-A. Tal como se esperaba, se detectó un bajo nivel de actividad (15%) en células transfectadas con genes de PB1, PB2, PA, NP derivados de VDM-A a 39°C en comparación con A/AA/6/60 wt (A/AA wt).

25 Se generaron virus mutantes de PR8 y se recuperaron tal como se describió anteriormente. En resumen, se transfectaron células COS-7 y MDCK cultivadas conjuntamente con ocho plásmidos que codificaban para genes de HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M y NS de PR8 derivados de PR8. Para preparar un virus que lleva cuatro loci ts (PR8-4s), se usaron PB1-3s que contenía tres cambios en PB1 en las posiciones nt 1195 (K391E), nt 1766 (E581G) y nt 2005 (A661 T) y PB1-1s que contenía un cambio en PB2 en la posición 821 (N265S). Además, también se recuperó por separado un virus de PR8 que llevaba o bien tres mutaciones en PB1 (PR8-3s) o bien una mutación en PB2 (PR8-1s). Estos virus se muestran esquemáticamente en la figura 16. Los cuatro de los virus de PR8 mutantes recombinantes crecieron hasta un título muy alto en huevos embrionarios, alcanzando un título de 9,0 log<sub>10</sub>ufp/ml o mayor tal como se muestra en la tabla 10.

35 Para examinar la síntesis de proteínas virales en células infectadas, se infectaron células MDCK con virus a una m.o.i de 5 y se marcaron las células con <sup>35</sup>S-Trans a 7 h tras la infección durante 1 h. Se sometió el lisado de células marcadas a electroforesis con gel de poliacrilamida al 1,5% que contenía SDS y se obtuvieron autoradiografías. También se estudió la síntesis de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se recogieron células infectadas por virus a las 8 h tras la infección y se sometieron a electroforesis con un gel en gradiente del 4-15%. Se analizó con sonda la inmunotransferencia con anticuerpo anti-M1 o anticuerpo policlonal de pollo anti-VDM-A, seguido por incubación con anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se detectaron las bandas de proteína conjugada con anticuerpo mediante el sistema de detección quimioluminiscente (Invitrogen) seguido por exposición a película de rayos X.

40 Tal como se muestra en la figura 19, todas tenían un nivel similar de síntesis de proteínas a 33°C, sin embargo, a 39°C el nivel de síntesis de proteínas se redujo ligeramente para células infectadas por PR8-1s pero se redujo enormemente en células infectadas por PR8-3s y PR8-4s. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western también mostró esa síntesis de proteínas reducida en el orden de PR8-4s>PR8-3s>PR8-1s. Por tanto, la replicación reducida de los mutantes ts era probablemente el resultado de su replicación reducida a temperaturas no permisivas.

50 Se determinó la sensibilidad a la temperatura de los virus mutantes de PR8 mediante ensayo de placa de lisis con células MDCK a 33°C, 37°C, 38°C y 39°C. Se amplificaron los virus recuperados en huevos embrionarios y se introdujeron en células tal como se describió anteriormente. Tras la incubación de células infectadas por virus durante tres días a las temperaturas designadas, se inmunotiñeron monocapas celulares usando anticuerpos policlonales de pollo anti-VDM y se numeraron las placas de lisis. Se compararon los recuentos de placas de lisis obtenidos a cada una de las temperaturas para evaluar el fenotipo ts de cada virus. Se definió la temperatura de desactivación como la menor temperatura que tenía una reducción del título de 100 veces o superior en comparación con 33°C.

60 Tal como se muestra en la tabla 10 y en la figura 17, todos los mutantes se replicaron bien a 33°C aunque se observó una ligera reducción del título de virus. A 38°C se observó una reducción significativa del título de virus para todos los mutantes. A 39°C, se observó una reducción del título de virus superior a 4,0 log<sub>10</sub> para virus que llevaban los tres loci ts en el gen de PB1 (PR8-3s y PR8-4s). PR8-1s también era ts a 39°C. El fenotipo ts de PR8-4s era muy similar al de VDM-A que tenía una reducción de 4,6 log<sub>10</sub> a 39°C en comparación con 33°C. Aunque ninguno de los

tres mutantes de PR8 tenía una reducción superior a 2,0 log<sub>10</sub> del título de virus a 37°C, su morfología de placa de lisis era diferente de aquellas a 33°C. Tal como se muestra en la figura 18, el tamaño de placa de lisis para cada mutante sólo se redujo ligeramente a 33°C en comparación con PR8. Se observó una reducción significativa del tamaño de placa de lisis a 37°C para PR8-3s y mayor para PR8-4s. PR8-1s no tuvo reducción significativa del tamaño de placa de lisis a 37°C. A 39°C, sólo se observaron unas pocas placas de lisis de tamaño precisado tanto para PR8-3s como para PR8-4s. Se observó un tamaño de placa de lisis de aproximadamente el 30% del de PR8 wt para PR8-1s.

**Tabla 10. Sensibilidad a la temperatura de PR8 con los loci ts introducidos. Título de virus (log<sub>10</sub>ufp/ml)**

Virus	33°C	37°C	38°C	39°C
VDM-A	8,6	7,0	6,4	4*
Wt A/AA	8,7	8,7	8,9	8,3
PR8	9,6	9,5	9,5	9
PB8-1s	9,4	8,9	7,7	7,4
PB8-3s	9,2	8,8	7,8	5,2
PB8-4s	9,5	7,8	7,1	4,4

Se asignó un título de 4,0 cuando no se detectó ningún virus a diluciones de 10.000.

Se examinó la atenuación de los virus de PR8 mutantes en hurones. En resumen, se usaron hurones macho de 9-10 semanas de edad para evaluar la replicación de virus en las vías respiratorias de un huésped animal. Se alojaron hurones individualmente y se les inocularon por vía intranasal 8,5 log<sub>10</sub>ufp de virus. Tres días tras la infección, se sedaron los hurones con ketamina-HCl, se extirparon los pulmones y cornetes nasales (NT). Se diluyeron en serie los homogeneizados de tejido pulmonar y se titularon en huevos de gallina embrionados de 10 días. Se calculó el título de virus (log<sub>10</sub>DIE<sub>50</sub>/ml) en pulmones mediante el método de Karber. Se determinó la replicación de virus en NT mediante ensayo de placa de lisis y se expresó como log<sub>10</sub>ufp/ml.

Se midieron los niveles de replicación de virus en pulmones y cornetes nasales mediante ensayos de DIE<sub>50</sub> o de placa de lisis (tabla 11). Tres días tras la infección, PR8 se replicó a un nivel de 5,9 log<sub>10</sub>DIE<sub>50</sub>/gramo de tejidos pulmonares. Sin embargo, PR8-1s mostró una reducción de 3,0 log<sub>10</sub> en la replicación en pulmones de hurón y se detectó muy poca replicación para PR8-3s. No se detectó replicación para PR8-4s que se estudió en dos grupos de virus infectados con virus obtenidos independientemente. El límite de detección de virus en pulmones de hurón mediante ensayo de DIE<sub>50</sub> es de 1,5 log<sub>10</sub> y por tanto se asignó un título de 1,5 log<sub>10</sub>DIE<sub>50</sub> para PR8-4s. Como control, VDM-A no se replicó en pulmones de hurón y A/AA/6/60 wt se replicó hasta un título de 4,4 log<sub>10</sub>. Se examinó la replicación de virus en cornetes nasales (NT) mediante ensayo de placa de lisis con células MDCK. PR8 se replicó hasta un título de 6,6 log<sub>10</sub>ufp/g en la nariz. Sólo se observaron ligeras reducciones del título de virus para PR8-1s y PR8-3s. Se observó una reducción de 2,2 log<sub>10</sub> para PR8-4s (A), mientras que se observó una reducción de 4,3 log<sub>10</sub> para PR8-4s (B), que llevaba un cambio en el gen de PB1 (E390G). La replicación enormemente reducida de PR8-4s (B) se correlaciona bien con su fenotipo ts a 37°C. En este caso se usó una dosis infecciosa de 8,5 log<sub>10</sub>ufp en vez de 7,0 log<sub>10</sub>ufp que se usó habitualmente para evaluar el fenotipo de atenuación de vacunas de influenza derivadas de VDM-A. Este resultado indicó que PR8 que llevaba los cuatro loci ts derivados de VDM-A estaba atenuado en cuanto a su replicación en las vías respiratorias bajas de hurones.

**Tabla 11. Replicación de mutantes de PR8 en hurones**

Virus	Hurones	Dosis (log <sub>10</sub> ufp)	Título de virus en pulmones (log <sub>10</sub> DIE <sub>50</sub> /g ± EE)	Título de virus en cornetes nasales (log <sub>10</sub> /g ± EE)
PR8	4	8,5	5,9 ± 0,3	6,6 ± 0,1
PR8-1s	4	8,5	3,8 ± 0,4	5,9 ± 0,2
PR8-3s	4	8,5	1,7 ± 0,1	5,8 ± 0,3
PR8-4s (A)	4	8,5	1,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,2
PR8-4s (B) <sup>b</sup>	4	8,5	1,5 ± 0,0	2,3 ± 0,3
VDM-A	4	8,5	1,5 ± 0,0	4,6 ± 0,1
Wt A/AA	4	8,5	4,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1

No se detectó virus y se asignó un título de 1,5 log<sub>10</sub>DIE<sub>50</sub>/g  
El virus contiene un cambio adicional en PB1-1193 (E390G)

Tanto en los ensayos de ts como de att, el virus mutante de PR8 mostró fenotipos tanto ts como att que eran similares al de VDM-A. Estos datos indican que la introducción de las sustituciones de aminoácidos únicos del VDM-A en una cepa de virus influenza divergente da como resultado un virus que muestra los fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados deseables para producir, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas. Adicionalmente, el virus de PR-8 ts, att, creció hasta un título alto que era adecuado para su uso como virus donador maestro para la producción de vacunas de influenza inactivadas o atenuadas vivas. Los resultados indican que las cinco mutaciones de VDM-A: PB1-391E, PB1-581G, PB1-661T, PB2-265S y NP-34G, pueden conferir los fenotipos ts y att a cualquier cepa de influenza A. De manera similar, pueden producirse cepas B ts, att, novedosas adecuadas para la producción de vacunas introduciendo las mutaciones de la cepa de VDM-B en virus de cepas de influenza B.

Además de producir vacunas de virus atenuado vivo, la introducción de estas mutaciones en cepas donadoras conducirá a la producción de vacunas inactivadas más seguras.

**EJEMPLO 5: SISTEMA DE OCHO PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE VDM-B**

5 Se extrajo ARN viral de una variante adaptada al frío de influenza B/Ann Arbor/1/66 (ca/Master Ann Arbor/1/66 P1 Aviron 10/2/97), una cepa donadora maestra de influenza B a modo de ejemplo (VDM-B), a partir de 100 µl de fluido alantoideo de huevos embrionados infectados usando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), y se eluyó el ARN en 40 µl de H<sub>2</sub>O. Se realizó RT-PCR de segmentos genómicos usando el kit One Step RT-PCR (Qiagen, Valencia, CA) según el protocolo proporcionado, usando 1 µl de ARN extraído para cada reacción. Se realizó la reacción de RT  
10 durante 50 min. a 50°C, seguido por 15 min. a 94°C. Se realizó la PCR durante 25 ciclos a 94°C durante 1 min., 54°C durante 1 min. y 72°C durante 3 min. Se amplificaron los genes P usando cebadores específicos de segmento con sitios de BsmBI que dieron como resultado la generación de dos fragmentos (tabla 12).

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

	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>
PB1	<b>Bm-PB1b-1</b> : (SEQ ID NO: 53)	<b>Bm-PB1b-1200R</b> : (SEQ ID NO: 54)
[1A]	TATTCCTCTCACCCAGCAGAAGCGGAGCCTTTA AGATG	TATTCCTCTCGATGCCGTTCTTTCATTGAA GAATGG
PB1	<b>Bm-PB1b-1220</b> : (SEQ ID NO: 55)	<b>Bm-PB1b-2369R</b> : (SEQ ID NO: 56)
[1B]	TATTCGTCTCGGCATCTTTGTGCGCTGGGATGA TGATG	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCCTT
PB2	<b>Bm-PB2b-1</b> : (SEQ ID NO: 57)	<b>Bm-PB2b-1145R</b> : (SEQ ID NO: 58)
[2A]	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGAGCGTTTT CAAGATG	TATTCGTCTCTCATTGCTCTTTTTTAATATT CCCC
PB2	<b>Bm-PB2b-1142</b> : (SEQ ID NO: 59)	<b>Bm-PB2b-2396R</b> : (SEQ ID NO: 60)
[2B]	TATTCGTCTCATGAGAATGGAAAACTACTAATA AATTCAGC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCATT
PA	<b>Bm-Pab-1</b> : (SEQ ID NO: 61)	<b>Bm-PAb-1261R</b> : (SEQ ID NO: 62)
[3A]	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGTGCGTTTG A	TATTCCTCTCCCAGGGCCCTTTACTTGTGAGA GTGC
PA	<b>Bm-Pab-1283</b> : (SEQ ID NO: 63)	<b>Bm-PAb-2308R</b> : (SEQ ID NO: 64)
[3B]	TATTCGTCTCTCCTGGATCTACCAGAAATAGGG CCAGAC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGTGCATT
HA	<b>VDM-B 5'BsmBI-HA</b> : (SEQ ID NO: 65)	<b>VDM-B 3'BsmBI-HA</b> : (SEQ ID NO: 66)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATT CTAATATC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATT TTTC
NP	<b>Ba-NPb-1</b> : (SEQ ID NO: 67)	<b>Ba-NPb-1842R</b> : (SEQ ID NO: 68)
	TATTGGTCTCAGGGAGCAGAAGCACAGCATT CTTGT	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAACAGCATT TTT
NA	<b>VDM-B 5'BsmBI-NA</b> : (SEQ ID NO: 69)	<b>VDM-B 3'BsmBI-NA</b> : (SEQ ID NO: 70)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATCT CTCAAAAC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATT TTTCAG
M	<b>VDM-B 5'BsmBI-M</b> : (SEQ ID NO: 71)	<b>VDM-B 3'BsmBI-M</b> : (SEQ ID NO: 72)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCACGCACTT TTAAAATG	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACGCACT TTCCAG
NS	<b>VDM-B 5'BsmBI-NS</b> : (SEQ ID NO: 73)	<b>VDM-B 3'BsmBI-NS</b> : (SEQ ID NO: 74)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGGATT TTTAGTC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGGATT TTTAT

Las secuencias complementarias a las secuencias de influenza se muestran en negrita. Los extremos 5' tienen secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción BsmBI (Bm) o BsaI (Ba).

Clonación de plásmidos

15 Se aislaron fragmentos de PCR, se digirieron con BsmBI (o BsaI para NP) y se insertaron en pAD3000 (un derivado de pHW2000 que permite la transcripción de ARNv de sentido negativo y ARNm positivo) en el sitio de BsmBI tal como se describió anteriormente. Se secuenciaron de dos a cuatro de cada uno de los plásmidos resultantes y se compararon con la secuencia consenso de VDM-B basándose en la secuenciación de los fragmentos de RT-PCR directamente. Los plásmidos que tenían sustituciones de nucleótido que daban como resultado cambios de aminoácido diferentes de la secuencia consenso se “repararon” o bien clonando los plásmidos o bien usando el kit  
20 Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA). Los plásmidos de B/Ann Arbor/1/66 resultantes se denominaron pAB121-PB1, pAB122-PB2, pAB123-PA, pAB124-HA, pAB125-NP, pAB126-NA, pAB127-M y pAB128-NS. Usando este sistema de transcripción bidireccional todas las proteínas y ARN virales se producen intracelularmente, dando como resultado la generación de virus influenza B infecciosos (figura 4).

Debe destacarse que pAB121-PB1 y pAB124-HA tenían 2, y pAB128-NS tenía 1, sustitución de nucleótido silenciosa

en comparación con la secuencia consenso (tabla 13). Estos cambios de nucleótido no dan como resultado alteraciones de aminoácidos, y no se prevé que afecten al rescate y crecimiento viral. Estas sustituciones silenciosas se han conservado para facilitar el genotipado de los virus recombinantes.

Tabla 13. Conjunto de plásmidos que representan los ocho segmentos de B/Ann Arbor/1/66 (VDM-B)

Seg.	plásmidos	nucleótidos	proteína
PB1	PAB121-PB1	A924>G924; C1701>T1701	silencioso
PB2	PAB122-PB2	consenso	---
PA	PAB123-PA	consenso	---
HA	PAB124-HA	T150>C150; T153>C153	silencioso
NP	PAB125-NP	consenso	---
NA	PAB126-NA	consenso	---
M	PAB127-M	consenso	---
NS	PAB128-NS	A416>G416	NS1: silencioso

5 Para la construcción de los plásmidos con sustitución de nucleótidos en los genes de PA, NP y M1, se usaron los plásmidos pAB123- PA, pAB125-NP, pAB127-M como moldes. Se cambiaron nucleótidos mediante el kit Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA). Alternativamente, se amplificaron dos fragmentos mediante PCR usando cebadores que contenían las mutaciones deseadas, se digirieron con BsmBI y se insertaron en pAD3000-BsmBI en una reacción de ligación de tres fragmentos. Se secuenciaron los plásmidos generados para garantizar que el ADNc  
10 no contenía mutaciones no deseadas.

Se determinó la secuencia de ADN de molde usando kits listos para reacción de secuenciación con tinte d-rodamina o rodamina terminador de ciclo con ADN polimerasa FS de AmpliTaq® (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA). Se separaron muestras mediante electroforesis y se analizaron con secuenciadores de ADN de PE/ABI modelo 373, modelo 373 Stretch o modelo 377.

15 En un experimento separado, se amplificó ARN viral a partir de influenza B/Yamanshi/166/98 y se clonó en pAD3000 tal como se describió anteriormente con respecto a la cepa de VDM-B, con la excepción de que se realizó la amplificación durante 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos. Se usaron cebadores idénticos para la amplificación de los segmentos de la cepa B/Yamanashi/166/98, con la sustitución de los siguientes cebadores para la amplificación de los segmentos de NP y NA: **VDM-B 5'BsmBI-NP:**  
20 **TATTCGTCTCAGGGAGCAGAACCACAGCATTCTTGTG** (SEQ ID NO: 75) y **VDM-B 3'BsmBI-NP:**  
**ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACAGCATTITTTTAC** (SEQ ID NO: 76) y **Bm-NAb-1:**  
**TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCA** (SEQ ID NO: 77) y **Bm-NAb-1557R:**  
**ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCA TTTT** (SEQ ID NO: 78), respectivamente. Los plásmidos de B/Yamanashi/166/98 se identificaron pAB251-PB1, pAB252-PB2, pAB253-PA, pAB254-HA, pAB255-NP, pAB256-  
25 NA, pAB257-M y pAB258-NS. Se identificaron tres diferencias de nucleótidos silenciosas en PA que facilitaban el genotipado de virus de B/Yamanashi/166/98 recombinante y reordenante.

#### EJEMPLO 6: GENERACIÓN DE VIRUS INFLUENZA REORDENADO E INFLUENZA B RECOMBINANTE INFECCIOSO

30 Para superar los obstáculos encontrados al intentar hacer crecer influenza B en un sistema de cultivo celular libre de virus cooperador, la presente invención proporciona vectores y protocolos novedosos para la producción de virus influenza de cepa B recombinantes y reordenantes. El sistema de vector usado para el rescate de virus influenza B se basa en el desarrollado para la generación de virus influenza A (Hoffmann *et al.* (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids, Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113; Hoffmann & Webster (2000) Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids, J Gen Virol 81:2843-7). Se cultivaron conjuntamente células 293T o COS-7 (células de primate con alta eficacia de transfección y actividad combinada) con células MDCK (permissivas para virus influenza), se mantuvieron células 293T en medio OptiMEM I-AB que contenía el 5% de células de FBS, se mantuvieron células COS-7 en medio DMEM I-AB que contenía el 10% de FBS. Se mantuvieron células MDCK en 1x MEM, el 10% de FBS con la adición de agentes antibióticos y antimicóticos. Antes de la transfección con los vectores de genoma viral, se lavaron las células una vez con 5 ml de PBS o medio sin FBS. Se añadieron diez ml de tripsina-EDTA a células confluentes en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> (se incubaron células MDCK durante 20-45 min., se incubaron células 293T durante 1 min.). Se centrifugaron las células, y se resuspendieron en 10 ml de OptiMEM I-AB. Entonces se diluyó un ml de cada línea celular suspendida en 18 ml de OptiMEM I-AB, y se mezcló. Entonces se extrajeron alícuotas de las células en una placa de 6 pocillos a 3 ml/pocillo. Tras 6-24 horas, se mezcló 1 µg de cada plásmido  
40 en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con OptiMEM I-AB a los plásmidos (x µl de plásmidos + x µl de de OptiMEM I-AB + x µl de TransIT-LT1 = 200 µl); 2 µl de TransIT-LT1 por µg de ADN de plásmido. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 45 min. Después se añadieron 800 µl de OptiMEM I-AB. Se retiró el medio de las células, y se añadió la mezcla de transfección a las células (t = 0) a 33°C durante 6-15 horas. Se retiró lentamente la mezcla de transfección de las células, y se añadió 1 ml de OptiMEM I-AB, y se incubaron las células a 33°C durante 24 horas.  
45 Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se añadió 1 ml de OptiMEM I-AB que contenía TPCK-tripsina 1 µg/ml a las células. A las 96 horas tras la transfección, se añadió 1 ml de OptiMEM I-AB que contenía TPCK-tripsina 1 µg/ml

a las células.

Entre 4 días y 7 días tras la transfección, se extrajo 1 ml del sobrenadante de cultivo celular y se monitorizó mediante ensayo de HA o de placa de lisis. En resumen, se extrajo como alícuota 1 ml de sobrenadante en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se transfirieron novecientos  $\mu$ l de sobrenadante a un nuevo tubo, y se realizaron diluciones en serie a 500  $\mu$ l/pocillo a células MDCK (por ejemplo, en placas de 12 pocillos). Se incubó el sobrenadante con las células durante 1 hora, después se retiró, y se sustituyó por medio de infección (1xMEM) que contenía 1  $\mu$ g/ml de TPCK-tripsina. Entonces se realizó un ensayo de HA o ensayos de placa de lisis. Por ejemplo, para los ensayos de placa de lisis se titularon sobrenadantes con células MDCK que se incubaron con un recubrimiento de agarosa al 0,8% durante tres días a 33°C. Para la infección de huevos, se recogió el sobrenadante de células transfectadas seis o siete días tras la transfección, se inyectaron 100  $\mu$ l de las diluciones de virus en Opti-MEM I en huevos de gallina embrionados de 11 días a 33°C. Se determinó el título tres días tras la inoculación mediante ensayo de DICT<sub>50</sub> en células MDCK.

Para generar VDM-B, se transfectaron células o bien 293T-MDCK o bien COS-7-MDCK cultivadas conjuntamente con 1  $\mu$ g de cada plásmido. Cuando se examinaron a de 5 a 7 días tras la transfección las células MDCK cultivadas conjuntamente mostraron efectos citopáticos (CPE), lo que indica la generación de virus VDM-B infeccioso a partir de ADNc clonado. No se observó CPE en células transfectadas con siete plásmidos (tabla 14). Para determinar la eficacia del sistema de transfección de ADN para la generación de virus, se titularon sobrenadantes de células siete días tras la transfección con células MDCK y se determinó el título de virus mediante ensayo de placa de lisis. El título de virus del sobrenadante células 293T-MDCK cultivadas conjuntamente fue de  $5,0 \times 10^6$  ufp/ml y de  $7,6 \times 10^6$  ufp/ml en células COS7-MDCK cultivadas conjuntamente.

Tabla 14. Generación de virus influenza B infeccioso a partir de ocho plásmidos

segmento	1	2	3	4
PB1	pAB121-PB1	---	PAB121-PB1	---
PB2	pAB122-PB2	pAB122-PB2	PAB122-PB2	pAB122-PB2
PA	pAB123-PA	pAB123-PA	pAB123-PA	pAB123-PA
HA	pAB124-HA	pAB124-HA	pAB124-HA	pAB124-HA
NP	pAB125-NP	pAB125-NP	pAB125-NP	pAB125-NP
NA	pAB126-NA	pAB126-NA	pAB126-NA	pAB126-NA
M	pAB127-M	pAB127-M	pAB127-M	pAB127-M
NS	pAB128-NS	pAB128-NS	pAB128-NS	pAB128-NS
	células 293T-MDCK cultivadas conjuntamente		células COS-7-MDCK cultivadas conjuntamente	
CPE	+	-	+	-
ufp/ml	$5,0 \times 10^6$	0	$7,6 \times 10^6$	0

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

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

### 30 Genotipado de influenza B recombinante

Tras un pase posterior con células MDCK, se usó la RT-PCR del sobrenadante de células infectadas para confirmar la autenticidad del virus generado. Se realizó RT-PCR con cebadores específicos de segmento para los ocho segmentos (tabla 12). Tal como se muestra en la figura 5A, se generaron productos de PCR para todos los segmentos. La secuenciación directa de los productos de PCR de los segmentos de PB1, HA y NS reveló que los cuatro nucleótidos analizados eran los mismos que los encontrados en el plásmido pAB121-PB1, pAB124-HA y pAB128-NS. Estos resultados confirmaron que el virus generado se generó a partir de los plásmidos designados y excluyen (además de los controles negativos) cualquier posible contaminación de laboratorio con el virus original (figura 5B).

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

### Fenotipado de VDMr-B

El virus VDM-B muestra dos fenotipos característicos: sensibilidad a la temperatura (ts) y adaptación al frío (ca). Por definición, una diferencia de 2 log (o superior) en el título de virus a 37°C en comparación con 33°C define ts, ca se

define por una diferencia inferior a 2 log en el crecimiento de virus a 25°C en comparación con 33°C. Se infectaron células de riñón de pollo primarias (PCK) con el virus original VDM-B y con el virus transfectado derivado de plásmidos para determinar el crecimiento viral a tres temperaturas.

5 Para el ensayo de placa de lisis se usaron células MDCK confluentes (ECACC) en placas de seis pocillos. Se incubaron diluciones de virus durante 30-60 min. a 33°C. Se recubrieron las células con un recubrimiento de agarosa al 0,8%. Se incubaron células infectadas a 33°C o 37°C. Tres días tras la infección se tiñeron las células con disolución de cristal violeta al 0,1% y se determinó el número de placas de lisis.

10 Se realizó el ensayo de fenotipo ca-ts mediante titulación de DICT<sub>50</sub> de las muestras de virus a 25, 33 y 37°C. Este formato de ensayo mide el título de DICT<sub>50</sub> examinando el efecto citopático (CPE) de virus influenza sobre monocapas de células de riñón de pollo primarias en placas de cultivo celular de 96 pocillos a diferentes temperaturas (25°C, 33°C, 37°C). Este ensayo no depende de la morfología de placas de lisis, que varía con la temperatura y las cepas de virus; en vez de eso depende únicamente de la capacidad de virus influenza para replicarse y provocar CPE. Se suspendió una suspensión de células de riñón de pollo primarias (PCK), preparada mediante tripsinización del tejido primario, en medio MEM (de Earl) que contenía el 5% de FCS. Se sembraron células PCK en placas de cultivo celular de 96 pocillos durante 48 horas con el fin de preparar una monocapa con >90% de confluencia. Tras 48h, se lavó la monocapa de células PCK durante una hora con medio MEM libre de suero que contenía L-glutamina 5 mM, antibióticos, aminoácidos no esenciales, denominado medio de ensayo de fenotipo (PAM). Se preparó una dilución de diez veces en serie de las muestras de virus en bloques de 96 pocillos que contenían PAM. Entonces se sembraron en placas las muestras de virus diluidas sobre la monocapa de PCK lavada en las placas de 96 pocillos. A cada dilución de la muestra de virus, se usaron repeticiones de seis pocillos para la infección con el virus diluido. Se incluyeron células no infectadas como células control como replicado de 6 pocillos para cada muestra. Se tituló cada muestra de virus en 2-4 replicados. Se incluye virus de control de fenotipo con títulos predeterminados a 25°C, 33°C y 37°C en cada ensayo. Con el fin de determinar el fenotipo ts de las muestras de virus, se incubaron las placas durante 6 días a 33°C y 37°C en incubadoras de cultivo celular con el 5% de CO<sub>2</sub>. Para la caracterización del fenotipo ca se incubaron las placas a 25°C durante 10 días. Se calculó el título de virus mediante el método de Karber y se notifica como media (n=4) de Log<sub>10</sub> de título de DICT<sub>50</sub>/ml ± desviación estándar. Las desviaciones estándar de los títulos de virus presentados en las figuras 1-3 oscilaron entre 0,1 y 0,3. Se usó la diferencia en el título de virus a 33°C y 37°C para determinar el fenotipo ts y se usó la diferencia en el título a 25°C y 33°C de virus para determinar el fenotipo ca.

30 El virus VDM-B recombinante (VDMrec-B) derivado de plásmidos expresaba los dos fenotipos característicos en cultivo celular, ca y ts, tal como se esperaba. El fenotipo ca, replicación eficaz a 25°C, se mide funcionalmente como un diferencial en el título entre 25°C y 33°C inferior o igual a 2 log<sub>10</sub> cuando se somete a ensayo con células PCK. Tanto el VDM-B original como VDMrec-B expresaban ca; la diferencia entre 25°C y 33°C fue de 0,3 y 0,4 log<sub>10</sub>, respectivamente (tabla 15). El fenotipo ts también se mide observando los títulos a dos temperaturas diferentes con células PCK; sin embargo, para este fenotipo el título a 37°C debe ser inferior al título a 33°C en 2 log<sub>10</sub> o más. La diferencia entre 33°C y 37°C para el VDM-B original y VDMrec-B fue de 3,4 y 3,7 log<sub>10</sub>, respectivamente (tabla 15). Por tanto, el virus VDM-B derivado de plásmidos recombinante expresaba los fenotipos tanto ca como ts.

40 El virus recombinante tenía un título de 7,0 log<sub>10</sub> de DICT<sub>50</sub>/ml a 33°C y de 3,3 DICT<sub>50</sub>/ml a 37°C y de 8,8 log<sub>10</sub> de DICT<sub>50</sub>/ml a 25°C (tabla 15). Por tanto, el virus recombinante derivado de la transfección con los ocho plásmidos de segmentos genómicos de VDM-B de influenza tiene el fenotipo tanto ca como ts.

Tabla 15. Ensayo de fenotipo para VDM-B y VDMr-B generados a partir de plásmidos

Virus	Temperatura (°C)			Fenotipo
	25	33	37	
	Log <sub>10</sub> de DICT <sub>50</sub> /ml (media + DE)			
B/Ann Arbor/01/66 ca (VDM-B)	8,8 + 0,3	8,5 + 0,05	5,1 + 0,1	ca, ts
VDMrec-B	7,4 + 0,3	7,0 + 0,13	3,3 + 0,12	ca, ts
VDM-rec53-B	5,9 + 0,1	5,7 + 0,0	5,3 + 0,1	ca, no ts
Se infectaron células de riñón de pollo primarias con el virus original VDM-B y el virus recombinante derivado de plásmidos (VDMrec-B). Se determinó el título de virus a tres diferente temperaturas.				

EJEMPLO 7: PRODUCCIÓN DE VIRUS B/YAMANASHI/166/98 REORDENANTE

45 Se amplificaron los segmentos de HA y NA de varias cepas diferentes que representan los principales linajes de influenza B y se clonaron en pAD3000, esencialmente tal como se describió anteriormente. Se optimizaron los cebadores para la amplificación por RT-PCR simultánea de los segmentos de HA y NA. La comparación de las regiones terminales de los ARNV que representaban la región no codificante del segmento 4 (HA) y del segmento 6 (NB/NA) reveló que los 20 nucleótidos terminales en el extremo 5' y los 15 nucleótidos en el extremo 3' eran idénticos entre los genes de HA y NA de virus influenza B. Se sintetizó un par de cebadores para RT-PCR (las secuencias subrayadas son específicas para virus influenza B) Bm-NAb-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG CA (SEQ ID NO: 87); Bm-NAb-1557R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGT AAC AAG AGC ATT TT (SEQ ID NO: 88) y se usaron para amplificar simultáneamente los genes de HA y NA a partir de diversas cepas de

influenza B (figura 8). Se aislaron los fragmentos de PCR de HA y de NA de B/Victoria/504/2000, B/Hawaii/10/2001 y B/Hong Kong/330/2001, se digirieron con BsinBI y se insertaron en pAD3000. Estos resultados demostraron la aplicabilidad de estos cebadores para la generación eficaz de plásmidos que contenían los genes de HA y NA de influenza B a partir de diversos virus de tipo natural diferentes que representan los principales linajes de influenza B. Los productos de RT-PCR pueden usarse para secuenciarse y/o clonarse en los plásmidos de expresión.

Con el fin de demostrar la utilidad de B/Yamanashi/166/98 (un virus de tipo B/Yamagata/16/88) para expresar eficazmente antígenos de diversos linajes de influenza B, se generaron reordenantes que contenían PB1, PB2, PA, NP, M, NS de B/Yamanashi/166/98 y HA y NA de cepas que representaban los linajes tanto Victoria como Yamagata (reordenantes 6 + 2). Se transfectaron conjuntamente células COS7-MDCK cultivadas conjuntamente de manera transitoria con seis plásmidos que representaban B/Yamanashi/166/98 y dos plásmidos que contenían el ADNc de los segmentos de HA y NA de dos cepas del linaje B/Victoria/2/87, B/Hong Kong/330/2001 y B/Hawaii/10/2001, y una cepa del linaje B/Yamagata/16/88, B/Victoria/504/2000, según los métodos descritos anteriormente. De seis a siete días tras la transfección se titularon los sobrenadantes con células MDCK recientes. Los tres virus reordenantes 6+2 tenían títulos de entre 4 - 9 x 10<sup>6</sup> ufp/ml (tabla 16). Estos datos demostraron que los seis genes internos de B/Yamanashi/166/98 podían formar eficazmente virus infecciosos con segmentos génicos de HA y NA de ambos linajes de influenza B.

Se titularon sobrenadantes de células COS7-MDCK cultivadas conjuntamente seis o siete días tras la transfección y se determinó el título viral mediante ensayos de placa de lisis con células MDCK.

Tabla 16: Conjunto de plásmidos usado para la generación de B/Yamanashi/166/98 y reordenantes 6 + 2.

segmento					
1	---	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1
2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2
3	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA
4	pAB254-HA	pAB254-HA	<b>pAB281-HA</b>	<b>pAB285-HA</b>	<b>pAB287-HA</b>
5	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP
6	pAB256-NA	pAB256-NA	<b>pAB291-NA</b>	<b>pAB295-NA</b>	<b>pAB297-NA</b>
7	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M
8	pAB258-NA	pAB258-NA	pAR258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA
Virus recombinante	8	6 + 2	6 + 2	6 + 2	6 + 2
	B/Yamanashi / 166/98	B/Victoria/504/2000	B/Hawaii/10/2001	B/Hong Kong/330/2001	
ufp/ml <sup>a</sup>	0	4 x 10 <sup>6</sup>	9 x 10 <sup>6</sup>	6 x 10 <sup>6</sup>	7 x 10 <sup>6</sup>

Se obtienen títulos relativamente altos mediante replicación de B/Yamanashi/166/98 de tipo natural en huevos. Se realizaron experimentos para determinar si esta propiedad era un fenotipo inherente de los seis genes "internos" de este virus. Para evaluar esta propiedad, se comparó el rendimiento de B/Victoria/504/2000 de tipo natural, que sólo se replica moderadamente en huevos, con el rendimiento del reordenante 6+2 que expresa HA y NA de B/Victoria/504/2000. Se inocularon cada uno de estos virus además de B/Yamanashi/166/98 de tipo natural y recombinante en 3 ó 4 huevos de gallina embrionados, o bien a 100 o bien a 1000 ufp. Tres días tras la infección, se extrajeron los fluidos alantoideos de los huevos y se determinaron los títulos de DICT<sub>50</sub> con células MDCK. Los reordenantes 6+2 produjeron cantidades de virus en el fluido alantoideo similares a la cepa B/Yamanashi/166/98 de tipo natural y recombinante (figura 9). La diferencia en el título entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6+2 fue de aproximadamente 1,6 log<sub>10</sub> de DICT<sub>50</sub> (0,7-2,5 log<sub>10</sub> de DICT<sub>50</sub>/ml, IC del 95%). La diferencia entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6+2 se confirmó en tres experimentos separados (P <0,001). Estos resultados demostraron que las propiedades de crecimiento en huevos de B/Yamanashi/166/98 podían conferirse a antígenos de HA y NA que se expresan normalmente a partir de cepas que se replican escasamente en huevos.

**EJEMPLO 8: BASE MOLECULAR PARA LA ATENUACIÓN DE B/ANN ARBOR/1/66 CA**

El virus VDM-B (B/Ann Arbor/1/66 ca) está atenuado en seres humanos, muestra un fenotipo atenuado en hurones y muestra un fenotipo adaptado al frío y sensible a la temperatura en cultivo celular. Se compararon las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes internos de VDM-B con secuencias en la base de datos de influenza de Los Alamos (en la world wide web en: flu.lanl.gov) usando el algoritmo de búsqueda BLAST. Se identificaron ocho aminoácidos únicos para VDM-B, y no presentes en ninguna otra cepa (tabla 17). Los segmentos de genoma que codifican para PB1, BM2, NS1 y NS2 no muestran ningún residuo único sustituido. Las proteínas PA y M1 tienen cada una dos, y la proteína NP tiene cuatro, aminoácidos únicos sustituidos (tabla 17). Se encuentra un aminoácido sustituido en PB2 en la posición 630 (una cepa adicional cepa B/Harbin/7/94 (AF170572) también tiene un residuo de arginina en la posición 630).

Estos resultados sugirieron que los segmentos génicos PB2, PA, NP y M1 podían estar implicados en el fenotipo atenuado de VDM-B. De una manera análoga a lo descrito anteriormente para VDM-A, puede usarse el sistema de ocho plásmidos para generar recombinantes y reordenantes (únicos y/o dobles reordenantes, es decir, 7:1; 6:2) de una manera independiente de cooperador sencillamente mediante transfección conjunta de los plásmidos relevantes

en células cultivadas tal como se describió anteriormente con respecto a VDM-A. Por ejemplo, pueden usarse los 6 genes internos de B/Lee/40 junto con segmentos de HA y NA derivados de VDM-B para generar reordenantes 6 + 2.

**Tabla 17. Aminoácidos únicos sustituidos de B/Ann Arbor/1/66**

	N.º	B/Ann Arbor/1/66 ca		Secuencias alineadas (virus de tipo natural)		Número de secuencias alineadas	
		pos.	aminoácido	codón	aminoácido		codón
PB1	0	-	-	-	-	23	
PB2	1	630	Arg630	AGA	Ser630	AGC	23
PA	2	431	Met431	ATG	Val431	GTG	23
		497	His497	CAT	Tyr497	TAT	
NP	4	55	Ala55	GCC	Thr55	ACC	26
		114	Ala114	GCG	Val114	GTG	
		410	His410	CAT	Pro410	CCT, CCC	
		509	Thr509	GAC	Ala509	GGC	
M1	2	159	Gln159	CAA	His159	CAI	24
		183	Val183	GTG	M183	ATG	
BM2	0	-	-	-	-	24	
NS1	0	-	-	-	-	80	
NS2	0	-	-	-	-	80	

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

5 Con el fin de determinar si las 8 diferencias de aminoácidos únicos tenían algún impacto sobre los fenotipos de VDM-B característicos, se construyó un virus recombinante en el que las ocho posiciones de nucleótido codificaban para el aminoácido que refleja el complemento genético de influenza wt. Se construyó un conjunto de plásmidos en el que los ocho residuos de los genes de PA, NP y M1 se cambiaron mediante mutagénesis dirigida al sitio para reflejar los aminoácidos de tipo natural (tal como se indica en la tabla 17). Se generó un recombinante con los ocho cambios, denominado VDM-rec53-B, mediante transfección conjunta de los plásmidos construidos en células COS7-10 MDCK cultivadas conjuntamente. El cultivo conjunto de células MDCK y crecimiento a 33°C garantizó que el sobrenadante contenía altos títulos de virus de seis a siete días tras la transfección. Se titularon los sobrenadantes de las células transfectadas y se determinó el título con células MDCK mediante ensayo de placa de lisis y células PCK a 33°C y 37°C.

15 Tal como se muestra en la figura 13, en dos experimentos independientes diferentes, VDMrec-B expresó el fenotipo ts tanto en células MDCK como en células PCK. El virus reordenante triple VDM-rec53-B diseñado que alojaba los ocho cambios de aminoácido expresaba el fenotipo no ts, la diferencia en el título entre 33°C y 37°C era de tan sólo 0,7 log<sub>10</sub> en células PCK. Este título era inferior a la diferencia de 2 log<sub>10</sub> requerida, característica de la definición de ts y significativamente inferior a la diferencia de ~3 log<sub>10</sub> observada con VDMrec-B. Estos resultados muestran que la alteración de los ocho aminoácidos dentro de las proteínas PA, NP y M1 era suficiente para generar un virus similar al tipo natural, no ts, con glicoproteínas tanto homólogas como heterólogas.

20 Entonces se determinó la contribución de cada segmento génico al fenotipo ts. Se generaron recombinantes derivados de plásmido que alojaban el segmento génico de PA, NP o M con el complemento de aminoácidos de tipo natural mediante la técnica de transfección conjunta de ADN. Todos los únicos recombinantes génicos mostraron restricción del crecimiento a 37°C en células MDCK y en células PCK (figura 14), lo que indica que los cambios en ningún segmento génico individual podían revertir el fenotipo ts. Además, los virus recombinantes que llevaban los segmentos génicos tanto de NP como de M o de PA como de M juntos también conservaban el fenotipo ts. En cambio, los virus recombinantes que alojaban los segmentos génicos tanto de PA como de NP tenían una diferencia en el título entre 37°C y 33°C de 2,0 log<sub>10</sub> o menos, similar al VDM-rec53-B. Estos resultados muestran que los genes de NP y PA tienen una contribución principal al fenotipo ts.

30 Para determinar si la totalidad de los cuatro aminoácidos en la proteína NP y dos en la proteína PA contribuyen a no ts, se generaron dobles y triples recombinantes génicos con genes de NP y PA alterados (figura 15). La sustitución de dos aminoácidos en la proteína NP, A114 → V114 y H410 → P410, dio como resultado un fenotipo no ts. Virus con una única sustitución H410 → P410 en la nucleoproteína mostraron un fenotipo no ts en MDCK y PCK. Por otro lado, la sustitución única A55 → T55 mostró un fenotipo ts, al igual que la sustitución única en la posición 509. Estos resultados indican que los residuos de aminoácido V114 y P410 en NP están implicados en un crecimiento eficaz a 37°C (figura 21A). Se empleó una estrategia similar para analizar minuciosamente la contribución de los dos aminoácidos en el gen de PA. Se construyó un conjunto de recombinantes, que alojaban cada uno un segmento génico de NP con cuatro aminoácidos consenso de tipo natural y un gen de PA con tan sólo uno de los dos aminoácidos de tipo natural consenso. La sustitución de H497 → Y497 siguió siendo ts (figura 21B), lo que demuestra que este locus tenía poco impacto sobre la expresión del fenotipo. En cambio, la sustitución de M431 por V431 dio como resultado la reversión del fenotipo ts. Estos resultados muestran que los aminoácidos A114 y H410 en NP y M431 en PA son los principales determinantes para la sensibilidad a la temperatura de VDM-B.



Basándose en evidencias anteriores, un fenotipo ts y un fenotipo atenuado están altamente correlacionados. Está bien establecido que el virus B/Ann Arbor/1/66 ca no puede detectarse en tejido pulmonar de hurones infectados, mientras que virus influenza B no atenuados pueden detectarse en pulmones tras la infección intranasal. Para determinar si una mutación idéntica es subyacente a los fenotipos ts y att, se realizaron los siguientes estudios.

5 Se sometieron virus recombinantes obtenidos tras transfección a pases en huevos de gallina embrionados para producir una reserva de virus. Se inocularon a hurones de nueve semanas de edad por vía nasal 0,5 ml por orificio nasal de virus con títulos de 5,5, 6,0 ó 7,0 log<sub>10</sub> ufp/ml. Tres días tras la infección, se sacrificaron los hurones y se examinaron sus pulmones y cornetes nasales tal como se describió anteriormente.

10 Se infectaron hurones (cuatro animales en cada grupo) por vía intranasal con VDMrec-B o VDM-rec53-B. Tres días tras la infección con virus se extirparon los cornetes nasales y tejido pulmonar y se sometió a prueba la existencia de virus. No se detectó virus en los tejidos pulmonares de hurones infectados con 7,0 log<sub>10</sub> ufp de VDMrec-B. De los cuatro animales infectados con virus VDM-rec53-B con 7,0 log<sub>10</sub> ufp, en tres animales se detectó virus en tejido pulmonar (un animal en este grupo por motivos desconocidos). En dos de los cuatro tejidos pulmonares de hurones infectados con VDM-rec53-B a una dosis inferior (5,5 log ufp/ml) pudo aislarse virus a partir de tejido pulmonar. Por tanto, el cambio de los ocho aminoácidos únicos en proteína PA, NP y M1 por residuos de tipo natural fue suficiente para convertir un fenotipo att en un fenotipo no att.

15 Dado que los datos en cultivo celular mostraron que PA y NP son contribuyentes principales al fenotipo ts, en un segundo experimento, se infectaron hurones con VDM-rec53-B (PA, NP, M), VDM-rec62-B (PA), NP VDM-rec71-B (NP) con 6 log ufp. Dos de los cuatro animales infectados con VDM-rec53-B tenían virus en el pulmón. Ninguno de los tejidos pulmonares de hurones infectados con virus únicos y dobles reordenantes tenía niveles detectables de virus. Por tanto, además de los aminoácidos en las proteínas PA y NP, la proteína M1 es importante para el fenotipo att. El virus con PA y NP wt no se replicó en pulmón de hurón, lo que indica que un subconjunto de las mutaciones implicadas en la atenuación está implicado en el fenotipo ts.

20 Por tanto, los fenotipos ts y att de B/Ann Arbor/1/66 se determinan por, como máximo, tres genes. La conversión de ocho aminoácidos en la proteína PA, NP y M1 en residuos de tipo natural dio como resultado un virus recombinante que se replicó eficazmente a 37°C. De manera similar, un virus recombinante 6+2 que representaba los seis genes internos de VDM-B con los segmentos de HA y NA de B/Hong Kong/330/01 mostró un fenotipo ts y el recombinante triple no era ts.

25 Los resultados usando la estructura principal de VDM-B indicaron que seis aminoácidos eran suficientes para convertir un fenotipo ts/att en un fenotipo no ts/no att. Por tanto, resultó interesante determinar si la introducción de esos seis residuos de "atenuación" transferiría esas propiedades biológicas a un virus influenza B no atenuado, de tipo natural, heterólogo, tal como B/Yamanashi/166/98.

30 Se produjeron B/Yamanashi/166/98 (recYam) de tipo natural recombinante (7) y un virus recombinante (rec6-Yam): con seis cambios de aminoácido PA (V431→M431, H497→Y497), NP (V114→A114, P410→H410) y M1 (H159→Q159, M183→V183). RecYam mostró una reducción del título de 0,17 log<sub>10</sub> en el título a 37°C en comparación con 33°C, mientras que rec6Yam era claramente ts, la diferencia en el título viral entre 37°C y 33°C fue de 4,6 log<sub>10</sub>. Se recuperó eficazmente virus de hurones infectados con recYam, tal como se esperaba para un virus influenza B de tipo natural típico. Cuando se inoculó rec6Yam en hurones, no se detectó virus en los tejidos pulmonares (tabla 18). Por tanto, la transferencia de los loci de ts/att de VDM-B es suficiente para transferir los fenotipos ts y att a un virus divergente.

Tabla 18. Estudios de atenuación en hurones

Virus recombinante	Componentes wt <sup>a</sup>	Fenotipo ts	Hurones	Dosis [log <sub>10</sub> ufp]	Cornetes nasales <sup>b</sup> [log <sub>10</sub> ufp/g]	Tejido pulmonar [log <sub>10</sub> DIE <sub>50</sub> /g] <sup>c</sup>
VDMr-B	ninguno	ts	4	6,0	4,01	<1,5
rec53-B	NP, PA, M	no ts	4	6,0	4,65	3,81
rec62-B	NP, PA	no ts	4	6,0	4,69	<1,5
rec71NP-B	NP	ts	4	6,0	4,13	<1,5
rec71M-B	M	ts	4	6,0	4,17	<1,5
RecYam		no ts	4	6,0	4,92	3,31
rec6Yam		ts	4	6,0	4,02	<1,5

<sup>a</sup> Se usaron virus recombinantes con estructura principal de VDM-B que se diferenciaban en los aminoácidos de tipo natural (para más detalles, véase la tabla 2) para infectar hurones por vía intranasal. RecYam es B/Yamanashi / 166/98 recombinante y Rec6Yam representa un virus que tiene seis cambios de aminoácido de "VDM-B-atenuación" en NP, PA y M1 con una estructura principal de B/Yamanashi.

<sup>b</sup> Tres días tras la infección se determinó el título de virus de los cornetes nasales y tejido pulmonar, se muestra el título promedio de cuatro hurones infectados.

<sup>c</sup> <1,5 indica que no se detectó virus.

Tal como se describió anteriormente con respecto a cepas de influenza A, la sustitución de los residuos indicados

anteriormente, por ejemplo, PB2<sup>630</sup> (S630R); PA<sup>431</sup> (V431M); PA<sup>497</sup> (Y497H); NP<sup>55</sup> (T55A); NP<sup>114</sup> (V114A); NP<sup>410</sup> (P410H); NP<sup>509</sup> (A509T); M1<sup>159</sup> (H159Q) y M1<sup>183</sup> (M183V), confiere los fenotipos ts y att. Por consiguiente, variantes diseñadas artificialmente por ingeniería genética de virus de cepas de influenza B que tienen una o más de estas sustituciones de aminoácido muestran los fenotipos ts y att y son adecuadas para su uso, por ejemplo, como virus de cepa donadora maestra, en la producción de vacunas de virus influenza vivo atenuado.

#### EJEMPLO 9: RESCATE DE INFLUENZA A PARTIR DE OCHO PLÁSMIDOS MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS VERO

Anteriormente se ha sugerido que puede rescatarse influenza A recombinante a partir de células Vero (Fodor *et al.* (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA, *J. Virol.* 73: 9679-82; Hoffmann *et al.* (2002) Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccine, *Vaccine* 20:3165-3170). El método notificado requiere el uso de reactivos de lípidos y sólo se ha documentado para una única cepa de unas cepas de laboratorio de influenza A competentes de alta replicación (A/WSN/33 y A/PR/8/34), haciendo que tenga una aplicación limitada en la producción de virus atenuado vivo adecuado para la producción de vacunas. La presente invención proporciona un método novedoso para recuperar virus influenza recombinante a partir de células Vero usando electroporación. Estos métodos son adecuados para la producción de virus de cepas tanto de influenza A como de influenza B, y permiten la recuperación, por ejemplo, de virus atenuados, adaptados al frío, sensibles a la temperatura, a partir de células Vero que se hacen crecer en condiciones libres de suero facilitando la preparación de vacuna atenuada viva adecuada para su administración, por ejemplo, en formulaciones de vacuna intranasales. Además de su amplia aplicabilidad a través de cepas de virus, la electroporación no requiere reactivos adicionales aparte del medio de crecimiento para el sustrato celular y por tanto tiene menos potencial de contaminantes no deseados. En particular, este método es eficaz para generar virus recombinante y reordenante usando células Vero adaptadas para crecer en una condición libre de suero, tal como aislados de células Vero calificados como libres de patógenos y adecuados para la producción de vacunas. Esta característica respalda la elección de la electroporación como método apropiado para la introducción comercial de ADN en sustratos celulares.

Se comparó la electroporación con una variedad de métodos para la introducción de ADN en células Vero, incluyendo la transfección usando numerosos reactivos a base de lípidos, precipitación de fosfato de calcio y microinyección celular. Aunque se obtuvo algo de éxito usando reactivos a base de lípidos para el rescate de influenza A, se demostró que sólo la electroporación rescataba influenza B así como influenza A a partir de células Vero.

Un día antes de la electroporación, se dividieron células Vero confluentes al 90 - 100%, y se sembraron a una densidad de  $9 \times 10^6$  células por matraz T225 en MEM complementado con pen/estrep, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y el 10% de FBS (MEM, el 10% de FBS). Al día siguiente, se tripsinizaron las células y se resuspendieron en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por matraz T225. Entonces se sedimentaron las células y se resuspendieron en 0,5 ml de OptiMEM I por matraz T225. Opcionalmente, puede emplearse medio OptiMEM personalizado que no contiene componentes derivados de ser humano o animal. Tras la determinación de la densidad celular, por ejemplo, mediante recuento a una dilución de 1:40 en un hemocitómetro, se añadieron  $5 \times 10^6$  células a una cubeta de electroporación de 0,4 cm en un volumen final de 400  $\mu$ l de OptiMEM I. Entonces se añadieron veinte  $\mu$ g de ADN que consistía en una mezcla equimolar de ocho plásmidos que incorporaban el genoma o bien de VDM-A o bien de VDM-B en un volumen de no más de 25  $\mu$ l a las células en la cubeta. Se mezclaron suavemente las células golpeando y se sometieron a electroporación a 300 voltios, 950 microfaradios en un instrumento BioRad Gene Pulser II con un instrumento Capacitance Extender Plus conectado (BioRad, Hercules, CA). La constante de tiempo debe estar en el intervalo de 28 - 33 ms.

Se mezcló suavemente el contenido de la cubeta golpeando y 1-2 min. tras la electroporación se añadieron 0,7 ml de MEM, el 10% de FBS, con una pipeta de 1 ml. Se mezclaron de nuevo suavemente las células pipeteando arriba y abajo algunas veces y después se dividieron entre dos pocillos de una placa de 6 pocillos que contenía 2 ml por pocillo de MEM, el 10% de FBS. Entonces se lavó la cubeta con 1 ml de MEM, el 10% de FBS y se dividió entre los dos pocillos para un volumen final de aproximadamente 3,5 ml por pocillo.

En experimentos alternativos, se sometieron células Vero adaptadas a condiciones de crecimiento libre de suero, por ejemplo, en OptiPro (SFM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), a electroporación tal como se describió anteriormente excepto porque tras la electroporación en OptiMEM I, se diluyeron las células en OptiPro (SFM) en el que posteriormente se cultivaron para rescatar virus.

Entonces se hicieron crecer las células sometidas a electroporación en condiciones apropiadas para la replicación y recuperación del virus introducido, es decir, a 33°C para las cepas donadoras maestras adaptadas al frío. Al día siguiente (por ejemplo, aproximadamente 19 horas tras la electroporación), se retiró el medio y se lavaron las células con 3 ml por pocillo de OptiMEM I o de OptiPro (SFM). Se añadió un ml por pocillo de OptiMEM I o de OptiPro (SFM) que contenía pen/estrep a cada pocillo, y se recogieron los sobrenadantes diariamente reemplazando los medios. Se almacenaron los sobrenadantes a -80°C en SPG. Normalmente se observó producción de virus máxima entre 2 y 3 días tras la electroporación.

Tabla 19: Resultados del rescate de 8 plásmidos de cepas de VDM con diferentes tipos de células y mediante

diferentes métodos de transfección

Sustrato	Método	N.º de prueba	Resultado (virus infeccioso recuperado)
<b>VDM-B</b>			
COS-7/MDCK	Lipo	3	positivo
COS-7/MDCK	CaPO4	2	positivo
MRC-5	Lipo	5	negativo
MRC-5	CaPO4	3	negativo
MRC-5	Electroporación	2	negativo
WI-38	Lipo	2	negativo
WI-38	Electroporación	4	negativo
WI-38	Microinyección	1	negativo
LF1043	Lipo	1	negativo
LF1043	CaPO4	2	negativo
Vero	Lipo	7	negativo
Vero	CaPO4	2	negativo
Vero/MDCK	Lipo	1	negativo
Vero (suero)	Electroporación	5	positivo (5/5)
Vero (libre de suero)	Electroporación	4	positivo (4/4)
<b>VDM-A</b>			
Vero (suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)
Vero (libre de suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)

EJEMPLO 10: SISTEMA VECTOR DE VIRUS INFLUENZA PARA ADMINISTRACIÓN DE GENES

Los vectores de la presente invención también pueden usarse como sistemas de administración de genes y para terapia génica. Para tales aplicaciones es deseable generar virus influenza recombinante, por ejemplo, virus influenza A o B recombinante que expresa una proteína foránea. Por ejemplo, dado que el segmento 7 del virus influenza B no se somete a corte y empalme, proporciona un elemento genético conveniente para la inserción de secuencias de ácido nucleico heterólogas. El ARNm contiene dos cistrones con dos marcos de lectura abiertos que codifican para las proteínas M1 y BM2. El marco de lectura abierto de BM2 o M1 se sustituye por la secuencia heteróloga de interés, por ejemplo, un gen que codifica para la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP). Usando el sistema de vector basado en plásmido de la presente invención, se clona el ADNc que codifica para el marco de lectura abierto de M1-EGFP y de BM2 en dos plásmidos diferentes. El marco de lectura abierto está flanqueado por la región no codificante del segmento 7, que contiene las señales requeridas para la replicación y la transcripción. Alternativamente, se construyen dos plásmidos: uno que contiene el ORF de M1 y el otro que contiene EGFP-BM2. La transfección conjunta de los nueve plásmidos resultantes da como resultado la generación de un virus influenza B recombinante que contiene la secuencia génica heteróloga. De manera similar, puede expresarse EGFP a partir del segmento de NS1 de influenza A.

El virus influenza B "verde" a modo de ejemplo puede usarse para la normalización en ensayos de virus, tales como ensayos de micro-neutralización. La combinación de la tecnología basada en plásmido y la detección simple de expresión de proteínas (puede monitorizarse la fluorescencia derivada de EGFP mediante microscopía, tal como se ilustra en la figura 2), permite la optimización de la expresión de proteínas.

EJEMPLO 11: ESTUDIOS GENÉTICOS DE CEPAS DE VACUNA DE INFLUENZA H3N2 RECIENTES

La cepa A/AA/6/60 de influenza adaptada al frío atenuada viva, en realizaciones preferidas típicas, es el virus donador maestro (VDM-A) para vacunas FluMist™ de influenza A. Los 6 genes internos de VDM-A confieren los fenotipos adaptado al frío (ca), sensible a la temperatura (ts) y atenuado (att) a cada una de las cepas de vacuna. Usando genética inversa, se demuestra que se segregan múltiples aminoácidos entre tres segmentos génicos: PB1-K391E, E581G, A661T, PB2-N265S y NP-D34G que controlan la expresión de los fenotipos ts y att de VDM-A. El rescate de plásmidos de cepas de vacuna 6:2 permite una generación más eficaz de vacunas de influenza que técnicas de reordenamiento clásicas.

Las vacunas de influenza inactivadas para la temporada de 2003-04 contenían el antígeno A/Panama/99 (H3N2) y no podían provocar respuestas de anticuerpos robustas en niños seronegativos frente a las cepas H3N2 de tipo A/Fujian/411/02 con deriva que circularon durante esta temporada. Véanse las figuras 22 y 23. Desafortunadamente, A/Fujian/411/02 no se replicaba bien en huevos de gallina embrionados y, por tanto, se impidió su uso para la fabricación de vacunas. Usando la tecnología de genética inversa, se mostró que la pérdida del equilibrio de las actividades de HA y NA era responsable de la escasa replicación de la cepa de A/Fujian/411/02 prototipo en huevos. Véanse las figuras 29 a 34. El virus A/Fujian pudo conseguir su replicación eficaz en huevos o bien aumentando su actividad de HA o bien reduciendo su actividad de NA. Específicamente, se demuestra que aunque varias sustituciones de un único aminoácido diferentes pudieran potenciar ligeramente la replicación de la cepa A/Fujian/411/02 en huevos, varias combinaciones dieron una potenciación mucho más robusta. Véanse las figuras 35 a 38. Este trabajo ha demostrado la viabilidad de mejorar el crecimiento de virus influenza en huevos de gallina embrionados y/o células huésped introduciendo cambios específicos en los genes de HA o NA sin afectar a la

antigenicidad del virus.

Para producir una cepa viable en huevos, se evaluó un conjunto de reordenantes 6:2 de H3N2 relacionados del linaje de A/Fujian/411/02 para determinar su replicación en células MDCK, huevos embrionados y hurones. Mientras que A/Fujian/411/02 no creció en huevos, una adaptación a huevos de este virus dio como resultado dos sustituciones de aminoácido en HA, H183L y V226A, que permitieron crecimiento de virus en huevos embrionados. Adicionalmente, se compararon una cepa de A/Wyoming/03/2003 adaptada a huevos que creció bien en huevos y hurones y la vacuna de A/Sendai/H-F4962/02 que creció bien en huevos, pero se replicó escasamente en hurones, en cuanto a su secuencia. Se determinó que se requerían G186V y V226I en HA, y/o Q119E y K136Q en NA, para la replicación eficaz de virus *in vitro* e *in vivo*. No obstante, estos cambios de aminoácido no tenían ningún efecto sobre la antigenicidad de virus. Se contempla y se espera la adopción de tales técnicas para producir cepas que pueden crecer en huevos (para cepas que es difícil/problemático que crezcan en huevos) o para producir cepas que pueden crecer mejor en huevos (para cepas que ya pueden crecer en huevos) para otros virus influenza.

Se estudió la base molecular para la deriva antigénica de cepas de tipo A/Panama/99 a A/Fujian/02 cambiando agrupaciones de residuos de HA de A/Panama/99 por las de A/Wyoming/03. Véase la figura 24. Se examinó la antigenicidad de los reordenantes 6:2 modificados mediante ensayos de HAI y de microneutralización usando sueros de hurón de animales inmunizados o bien con A/Panama/99 o bien con A/Wyoming/03. Véanse las figuras 25 a 28. Se determinó que sólo unos pocos cambios eran responsables de la deriva antigénica mientras que otros tenían un impacto más drástico sobre la replicación de virus. Por tanto, tal como se indica por los datos, opcionalmente se usa genética inversa para modificar cepas de vacuna para aumentar rendimientos de vacuna sin afectar a la antigenicidad de virus.

#### Materiales y métodos

Cepas de virus, células y anticuerpos: Se obtuvieron cepas de virus influenza A de tipo natural (wt), A/Fujian/411/02 (A/Fujian), A/Sendai-H/F4962/02 (A/Sendai) y A/Wyoming/03/03 (A/Wyoming), del Centro para el Control de Enfermedades (Atlanta, GA) y se amplificaron una vez en células MDCK o en huevos de gallina embrionados (huevos). Se hizo crecer la cepa Ankara de virus vaccinia modificada que expresaba la ARN polimerasa de bacteriófago T7 (MVA-T7) en células CEK. Se mantuvieron células HEp-2, COS-7 y MDCK (obtenidas de colecciones americanas de cultivos tipo, ATCC) en medio esencial mínimo (MEM) que contenía el 5% de suero bovino fetal (FBS). Se produjeron antisueros policlonales contra A/Ann Arbor/6/60, A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/03 en pollos. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la proteína NP de influenza A de BioDesign (Saco, MI).

Generación de reordenantes 6:2 recombinantes: Se generaron reordenantes 6:2 recombinantes que contenían los segmentos de ARN de HA y NA de las cepas H3N2 reordenadas en VDM-A, según los procedimientos anteriormente descritos. En resumen, se transfeció un conjunto de seis plásmidos que contenían los genes internos de VDM-A junto con los plásmidos de expresión de HA y NA en las células COS-7/MDCK cultivadas conjuntamente usando reactivos TransIT LT1 (Mirus, Madison, WI). Se recogió el sobrenadante de cultivo celular transfecido a los 3 días tras la transfección y se usó para infectar a células MDCK recientes y huevos de gallina embrionados de 10 días. Se incubaron las células MDCK infectadas a 33°C hasta que el 80-90% de las células mostraron un efecto citopático. Se incubaron los huevos de gallina embrionados infectados a 33°C durante tres días y se extrajeron los fluidos alantoideos y se almacenaron a -80°C en presencia del estabilizador SPG (sacarosa 0,2 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,8 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,2 mM, glutamato de monosodio 5,4 mM). Se determinó el título de virus mediante ensayo de placa de lisis con células MDCK incubadas bajo un recubrimiento que consistía en 1 x L15/MEM, el 1% de agarosa y TPCK-tripsina 1 µg/ml a 33°C durante 3 días. Se numeraron las placas de lisis mediante inmunotinción usando anticuerpos policlonales de pollo anti-VDM-A.

Clonación de plásmidos de expresión de HA y NA: Para preparar virus reordenantes 6:2 recombinantes que contenían los segmentos de HA y NA de subtipo H3N2 y los seis segmentos de ARN de VDM-A internos, se amplificaron los ADNc de HA y NA de A/Sendai-H/F4962/02 wt y A/Wyoming/03/03 mediante RT-PCR usando transcriptasa inversa de SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y ADN polimerasa de Pfu (Stratagene, La Jolla, CA), el ARNv extraído como molde y los cebadores específicos de H3 y N2. Se usaron los cebadores HA-AarI5 (5'cacttatattcacctgcctcaggagcaaaagcagggg3' SEQ ID NO: 90) y HA-AarI3 (5'cctaacatatcacctgcctcgtattagtagaacaagggtgtt3' SEQ ID NO: 91) para amplificar el segmento de HA. Se usaron los cebadores N2-AarI5 (5'cacttatattcacctgcctcaggagcaaaagcaggagt3' SEQ ID NO: 92) y N2-AarI3 (5'cctaacatatcacctgcctcgtattagtagaacaaggagttt3' SEQ ID NO: 93) para amplificar el segmento de NA. Los pares de cebadores tanto de HA como de NA contenían los sitios de restricción de Aar I que se diseñaron para ser comparables con los sitios de BsmB I presentes en el plásmido de expresión pAD3000 pol I/pol II. Se secuenciaron los clones de ADNc de HA y NA y se compararon con las secuencias de HA y NA consenso que se obtuvieron mediante secuenciación directa de los productos de ADNc amplificados mediante RT-PCR de HA y NA. Se corrigió cualquier mutación introducida en los clones de ADNc durante el proceso de clonación mediante el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA).

Ensayo de HAI (ensayo de inhibición de la hemaglutinación para virus influenza): Reactivos: cRBC al 0,5% (lavado tres veces con PBS-, puede usarse en el plazo de 2-3 días); microplaca de fondo en U de 96 pocillos; PBS- (sin Ca

ni Mg); puntas; virus influenza; muestras de suero y suero de control positivo de título alto y bajo. Preparaciones: Determinar el título de virus de HA mediante ensayo de HA (usar título de virus a 1:8 para HAT. Si el título de HA de un virus dado es de 1:256, dividirlo entre 8. Por tanto, se necesita diluir el virus 1:32. Preparar 2,5 ml de virus para cada placa de 96 pocillos); tratar el suero con RDE (enzima destructora de receptor), opcional para muestras de hurones; preparar RDE según las instrucciones del fabricante; combinar RDE y muestra de suero a una dilución de 1:4. Por ejemplo, añadir 100 ul de suero a 300 ul de RDE. Agitar con vórtice la mezcla e incubar durante la noche (18-20 h) en una incubadora a 37°C. Calentar la mezcla a 56°C durante 45-50 min. Examinar el suero para detectar aglutininas no específicas; mezclar 25 ul de suero tratado con RDE con 25 ul de PBS- pipeteando arriba y abajo 3 x; añadir 50 ul de cRBC al 0,5% a la mezcla y al pocillo de control sólo con PBS-; incubar a TA durante 30-45 min. (+: indica hemaglutinación no específica completa o parcial; -: indica ausencia de hemaglutinación); pueden retirarse aglutininas de cRBC no específicas mediante incubación previa de suero con RBC empaquetados a una razón de 20:1 a 4°C durante 1 h, seguido por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. a 4°C 4) Los controles puede incluir normalmente lo siguiente: célula control cRBC; retrotitulación de virus: dilución de 2 veces de 8 unidades/50 ul de virus diluido desde 1:2 hasta 1:32 para asegurarse de que el virus usado está a las concentraciones correctas; control de suero positivo: diluir un suero de título conocido 2 veces en serie junto con las muestras de suero de prueba. Un protocolo de HAI típico puede comprender: Diluir muestras de suero dos veces en serie; añadir 25 ul de PBS- a cada pocillo; añadir 25 ul de virus al pocillo 1A (por ejemplo, 1:2), mezclar pipeteando arriba y abajo 3 x; transferir 25 ul del pocillo A al pocillo B (por ejemplo, 1:4) y mezclar como anteriormente 3x, repetir la dilución hasta el pocillo H (por ejemplo, 1:256); añadir 25 ul de virus (8 unidades/50 ul) a muestras de suero diluidas, mezclar pipeteando arriba y abajo 3x e incubar a TA durante 30-40 min.; añadir 50 ul de cRBC al 0,5%, mezclar bien pipeteando arriba y abajo 3x; incubar a TA durante 30-45 min.; registrar la hemaglutinación. El título de HAI se define como la mayor dilución del suero que inhibe completamente la hemaglutinación. Si no se observa inhibición, el título es <1:4. Si todos los pocillos presentan inhibición, el título es >1:256.

Medición de la actividad neuraminidasa de la proteína NA expresada transitoriamente:

Para medir la actividad neuraminidasa de las proteínas NA, se expresaron NA wt y sus derivados modificados a partir de las células transfectadas con plásmido. Para obtener un alto nivel de expresión de las proteínas NA, se transcribió el ARN de NA de los promotores de T7 y CMV ya que el gen se insertó en el sentido 3' de estos promotores dobles. Se infectaron células HEp-2 en placas de 10 cm con MVAT7 a una moi de 5,0 durante 1 h seguido por transfección de 5 µg del plásmido NA usando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se incubaron las células transfectadas a 35°C durante 48 h. Tras lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se rascaron las células de las placas y se sometieron a lisis en 100 µl de NaOAc 0,125 M, pH 5,0. Se determinó la actividad neuraminidasa en las células transfectadas mediante un ensayo fluorimétrico. Tras congelar-descongelar una vez, se diluyeron en serie 2 veces 50 µl de lisados celulares y se incubaron con 150 µl de sustrato ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuramínico (MU-NANA) 1,2 mM (Sigma, St. Louis, MO) a 37°C durante 1 h y se detuvo mediante 75 µl de glicina 1,0 M (pH 5,5). Se determinó el nivel de fluorescencia del cromóforo liberado 4-metilumbeliferona a 362 nm con un lector de placas SpectroMAX. Se monitorizó el nivel de cada proteína NA expresada en las células transfectadas mediante inmunotransferencia de tipo Western usando antisueros de pollo anti-A/Wyoming. También se midieron las actividades neuraminidasa de virus A/Wyoming y A/Sendai wt que contenían 6,0 log<sub>10</sub>ufp en 100 µl mediante el ensayo fluorimétrico.

Unión a receptor y replicación de recombinantes 6:2 en células MDCK:

Se determinaron la unión a receptor de HA y la cinética de crecimiento de reordenantes 6:2 recombinantes en células MDCK. Se infectaron células MDCK en placas de seis pocillos con 6:2 A/Fujian, A/Sendai, A/Wyoming y dos virus recombinantes modificados a una moi de 1,0. Tras 30 min. de adsorción o bien a 33°C o bien a 4°C, o bien se lavaron las células infectadas tres veces con PBS, o bien se recubrieron directamente con 3 ml de Opti-MEM I que contenía TPCK-tripsina 1 µg/ml y se incubaron a 33°C. Se fijó un conjunto de las placas infectadas con paraformaldehído al 1% a las 6 h tras la infección durante 15 min. a temperatura ambiente, y se permeabilizaron con el 0,2% de Triton X-100 en PBS durante 15 min. seguido por análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales anti-NP. Se analizaron las imágenes de células captadas por una cámara digital ORCA-100 mediante software de captura de imágenes y análisis de intensidad dinámico Compix, versión 5.3 (Cranberry Township, PA) para calcular el porcentaje de las células infectadas. Se incubó otro conjunto de placas a 33°C. A diversos intervalos de tiempo, se extrajeron 250 µl de sobrenadante de cultivo y se almacenaron a -80°C en presencia de SPG antes de la titulación de virus. Tras extraer cada alícuota, se añadió una cantidad igual de medio reciente a las células. Se determinó el título de virus en esas alícuotas mediante ensayo de placa de lisis con células MDCK a 33°C.

Para determinar si la diferencia de unión entre esos virus afectaba a la cinética de crecimiento de virus en células MDCK, se incubaron las células MDCK infectadas a 33°C y se recogieron los sobrenadantes de cultivo a diversos momentos para realizar la titulación de virus. Cuando se adsorbió a 33°C, 6:2 A/Fujian tenía una cinética de crecimiento más lenta y un título inferior (figura 2), 6:2 A/Sendai, A/ Fujian con HA-V186I226 o HA-L183A226 se comportaron de manera similar a 6:2 A/Wyoming. Cuando se realizó la adsorción a 4°C, 6: 2 A/Fujian así como 6:2 A/Sendai tenían una cinética de crecimiento más lenta. 6:2 A/Wyoming y las dos variantes de A/Fujian crecieron de manera similar. Los resultados concordaban con el ensayo de unión de virus mientras que la etapa de lavado redujo la infección eficaz de A/Fujian a ambas temperaturas.

Antigenicidad de virus recombinantes 6:2:

Se analizó la antigenicidad de cada virus mediante ensayo de inhibición de hemaglutinina (HAI) usando sueros de hurón anti-A/Sendai y anti-A/Wyoming. Se incubaron alícuotas de 25 µl de antisueros de hurón diluidos en serie 2 veces con 25 µl de virus que contenían 4 unidades de HA de virus reordenantes 6:2 a 37°C durante 1 h seguido por incubación con 50 µl de glóbulos rojos (RBC) de pavo al 0,5% a 25°C durante 45 min. Se definió el título de HAI como la inversa de la mayor dilución de suero que inhibió la hemaglutinación.

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

Se obtuvieron cepas de virus influenza A de tipo natural (wt), A/Fujian/411/02, A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/03, del Centro para el Control de Enfermedades (Atlanta, GA) y se amplificaron una vez en células MDCK o en huevos de gallina embrionados. Tal como se indica en la tabla 20, A/Fujian sólo se sometió a pase tres veces en cultivo celular, mientras que A/Sendai y A/Wyoming se sometieron a 11 pases en huevos. Se determinaron las secuencias de HA y NA de estas tres cepas mediante secuenciación de los productos de RT-PCR usando ARNv extraído de estos virus. La diferencia en la secuencia de HA y NA de estas tres cepas de H3N2 se indica en la tabla 1. A/Sendai era idéntico a A/Fujian en su secuencia de aminoácidos de HA1 pero diferente en la secuencia de NA en tres aminoácidos en las posiciones 119, 146 y 347. A/Wyoming tenía la secuencia de NA idéntica a la de A/Fujian, pero se diferenciaba de A/Fujian y A/Sendai en HA1 en cuatro aminoácidos. Además, tanto A/Sendai como A/Wyoming tenían Glu-150 en vez de Gly-150 en la HA2. Tras amplificar una vez en células MDCK, se mutó el residuo 183 en HA1 de A/Fujian wt de His-183 a Leu-183 y fue difícil aislar el virus A/Fujian wt con His-183, lo que indica que el virus con His-183 tenía ventaja de crecimiento *in vitro*.

Estos tres virus wt crecieron de manera diferente en células MDCK, alcanzando títulos de 6,1, 8,1 y 6,7 log<sub>10</sub>ufp/ml para A/Fujian wt, A/Sendai wt y A/Wyoming wt, respectivamente. A/Fujian wt se replicó escasamente en huevos, alcanzando un título de 4,1 log<sub>10</sub>ufp/ml (tabla 20). El virus aislado de huevos tenía el cambio de H183L en la HA. En cambio, A/Sendai wt y A/Wyoming wt crecieron bien en huevos teniendo títulos de 9,0 y 8,9 log<sub>10</sub>ufp/ml, respectivamente.

Para confirmar que los segmentos de HA y NA de estas cepas de H3N2 controlaban la replicación de virus en huevos y células, se reordenaron los segmentos génicos de HA y NA con los segmentos génicos internos de la cepa A/Ann Arbor/6/60 adaptada al frío, el virus donador maestro para vacunas FluMist de influenza atenuadas vivas (VDM-A) para generar tres virus reordenantes 6:2. Se evaluó la replicación de estos tres virus en células MDCK y huevos de gallina embrionados. 6:2 A/Fujian (6,2 log<sub>10</sub>ufp/ml) mostró un título inferior a 6:2 A/Sendai (7,1 log<sub>10</sub>ufp/ml) y A/Wyoming (7,0 log<sub>10</sub>ufp/ml) en células MDCK. De manera similar a A/Fujian wt, 6:2 A/Fujian se replicó escasamente en huevos de gallina embrionados con un título de 4,1 log<sub>10</sub>ufp/ml. Tanto 6:2 A/Sendai como A/Wyoming se replicaron con títulos superiores de 8,7 y 8,1 log<sub>10</sub>ufp/ml, respectivamente. Por tanto, la transferencia de los segmentos génicos de HA y NA wt en VDM-A no cambió la capacidad de cada virus para replicarse en huevos.

Tabla 20. Comparación de cepas similares a 6:2 A/Fujian/411/02 wt y recombinantes en la secuencia de HA y NA y su replicación en células MDCK y huevos.

Cepas de virus	Posiciones de aminoácido							
	HA1				HA2	NA		
	128	186	219	226	150	119	136	347
A/Fujian/ 411/02 <sup>(1)</sup> (C1/C2)	T	G	S	V	G	E	Q	H
A/Sendai- H/F4962/02 (CxE8/E3)	-	-	-	-	E	Q	K	Y
A/Wyoming/ 03/03 (ck2E2/E9)	A	V	Y/F	I	E	-	-	-

Cepas de virus (historial de pases)	Título de virus (log <sub>10</sub> ufp/ml ± DE) <sup>(3)</sup>			
	MDCK		Huevos	
	wt	6:2	wt	6:2
A/Fujian/ 411/02 <sup>(1)</sup> (C1/C2)	6,1 ± 0,3	6,2 ± 0,3 <sup>(2)</sup>	4,1 ± 0,6	4,2 ± 0,5
A/Sendai- H/F4962/02 (CxE8/E3)	8,1 ± 0,2	7,1 ± 0,1	9,0 ± 0,3	8,7 ± 0,2
A/Wyoming/ 03/03 (ck2E2/E9)	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,4	8,9 ± 0,3	8,1 ± 0,1

<sup>(1)</sup> A/Fujian wt tenía el cambio H183L tras un pase de una vez en células MDCK y huevos.  
<sup>(2)</sup> 6:2 A/Fujian recombinante contenía E150 en HA2.  
<sup>(3)</sup> Los títulos de virus se expresaron como log<sub>10</sub>ufp/ml ± DE media a partir de dos o más muestras.

Efecto de cambios de aminoácido en las NA sobre actividades neuraminidasa y replicación de virus

A/Fujian se diferenció de A/Sendai en tres aminoácidos en NA, E119Q, Q136K y H347Y (tabla 20), se plantea la hipótesis de que uno o más de estos cambios permitió a A/Sendai replicarse en huevos de gallina embrionados hasta un título superior al de A/Fujian. Se ha notificado que sustituciones de E119 por residuos de G, D, A o V para diversas cepas anti-neuraminidasa resistentes a fármacos dieron como resultado una actividad neuraminidasa reducida. Para determinar si E119Q o cualquiera de los otros dos cambios en la NA tenían un efecto sobre la

5 actividad de NA de A/Fujian y sobre su capacidad para replicarse en huevos de gallina embrionados, se introdujeron mutaciones de una única y de dos sustituciones en plásmidos de expresión de NA de A/Fujian y se midió la actividad de NA en las células HEp-2 transfectadas. Además, también se recuperaron virus recombinantes 6:2 recombinantes que llevaban mutaciones en la NA de A/Fujian y se comparó su crecimiento en células MDCK y en huevos (tabla 21). A/Fujian (E119Q136H147) tenía una actividad de NA aproximadamente un 80% superior en comparación con la de A/Sendai (Q119K136Y147). La mutación Q119 individual tenía un 66% de actividad de NA, el cambio Y347 tenía un efecto mínimo sobre la actividad de NA pero K136 sólo tenía un 25% de actividad. Las mutaciones dobles, K136Y347, Q119Y347 y Q119K136, tenían actividad de NA reducida a niveles del 29%, 52% y 25% de la de A/Fujian, respectivamente. Estos datos indicaron que estos tres residuos de NA afectaron a la actividad de NA en el orden de K136>Q119>Y347.

10 Se examinó la correlación de la actividad de NA de los mutantes de NA con replicación de virus en huevos de gallina embrionados (tabla 21). Se mostró que los seis virus modificados se replicaban bien en células MDCK alcanzando títulos que oscilaban entre 6,2 y 6,9 log<sub>10</sub>ufp/ml, pero se replicaban de manera significativamente diferente en huevos. FJ-Q119 y FJ-347 que tenían una 66% y 99% de actividad de NA de A/Fujian no pudieron crecer en huevos. FJ-K136 con un 25% de actividad de NA pudo crecer hasta un título de 4,8 log<sub>10</sub>ufp/ml en huevos, pero 4,0 log<sub>10</sub> inferior al de A/Sendai (8,8 log<sub>10</sub>ufp/ml). De manera inesperada, aunque K136Y347 disminuyó significativamente la actividad de NA *in vitro*, el virus recombinante que llevaba estas dos mutaciones (FJ-K136Y347) no pudo replicarse en huevos de gallina embrionados. Q119Y347 que tenía un 52% de actividad de NA se replicó en huevos hasta un título de 4,5 log<sub>10</sub>fpu/ml. Q119K136 que tenía la actividad de NA ligeramente superior a la de A/Sendai se replicó hasta un título de 6,2 log<sub>10</sub>fpu/ml, pero todavía 2,6 log<sub>10</sub> inferior al de A/Sendai. Estos resultados indicaron que cada uno de los tres residuos de NA diferentes entre A/Fujian y A/Sendai tenían un impacto sobre la replicación de virus de manera diferente. Aunque varias mutaciones de NA pudieron reducir la actividad de NA hasta el nivel próximo al de A/Sendai, sólo los cambios Q136K y E119Q pudieron dar como resultado una mejora significativa en la replicación de virus en huevos de gallina embrionados. Dado que las dobles mutaciones Q119K136 no se replicaron tan eficazmente como virus A/Sendai en huevos, el residuo Y347 también podía afectar a la replicación de virus en huevos.

Tabla 21. Efectos de residuos de NA sobre la replicación de virus en células MDCK y huevos embrionados.

NA	residuos de NA			actividad de NA <sup>(1)</sup> (Media ± EE)	Título de virus <sup>(2)</sup> (Log <sub>10</sub> ufp/ml)	
	119	136	347		MDCK	Huevos
A/Fujian	E	Q	H	100	6,5	<1,5
FJ-Q119	Q	-	-	66 ± 3	6,7	<1,5
FJ-Y347	-	-	Y	99 ± 1	6,6	<1,5
FJ-K136	-	K	-	25 ± 1	6,6	4,8
FJK136Y347	-	K	Y	29 ± 3	6,5	<1,5
FJQ119Y347	Q	-	Y	52 ± 4	6,6	4,5
FJQ119K136	Q	K	-	25 ± 1	6,2	6,2
A/SENDAI	Q	K	Y	21 ± 1	6,9	8,8

<sup>(1)</sup> Las actividades de NA en células HEp-2 transfectadas con ADNc de NA se expresan como porcentaje de la de A/Fujian (media ± error estándar) de cuatro experimentos independientes.  
<sup>(2)</sup> Se generaron virus 6:2 recombinantes usando HA y NA de A/Fujian o NA de A/Fujian con las mutaciones indicadas.

Efectos de residuos de HA sobre la replicación de virus

30 Se investigaron los cambios de los cuatro residuos de HA1 en A/Wyoming/03/03 que se diferenciaban de A/Fujian para determinar sus papeles en la replicación de virus. Se introdujeron las mutaciones de una única y de múltiples sustituciones en ADNc de HA de A/Fujian y se introdujeron los plásmidos de HA modificados en VDM-A junto con cualquier NA de A/Fujian. Todos los mutantes de virus reordenante 6:2 se replicaron bien en células MDCK pero crecieron de manera diferente en huevos de gallina embrionados (tabla 33). Los reordenantes 6:2 con A/Fujian HA (T128G186S219V226) no pudieron replicarse en huevos. Un cambio individual T128A no mejoró el crecimiento de virus en huevos. Sin embargo, el cambio individual G186V o V226I dio como resultado una replicación de virus aumentada en huevos. Los cambios dobles G186V y V226I en HA se replicaron eficazmente en huevos. Sustituciones adicionales en los residuos 128 y/o 219 no aumentaron significativamente la replicación de virus. Por tanto, un mínimo de dos cambios G186V y V226I permitió a 6:2 A/Fujian crecer eficazmente en huevos de gallina embrionados.

40 TABLA 22. EFECTOS DE RESIDUOS DE HA SOBRE LA REPLICACIÓN DE VIRUS EN HUEVOS EMBRIONADOS.

Virus <sup>(1)</sup>	Residuos de HA				Título de virus en huevos (log <sub>10</sub> ufp/ml)
	128	186	219	226	
A/Fujian	T	G	S	V	<1,5
HA-A128	A	-	-	-	<1,5
HA-V186	-	V	-	-	4,9
HA-I226	-	-	-	I	5,2

HA-V186I226	-	V	-	I	7,6
HA-V186Y219I226	-	V	Y	I	7,5
A/Wyoming	A	V	Y	I	7,3

<sup>(1)</sup> Virus recuperado de las células transfectadas que contenían NA y HA de A/Fujian con los cambios de aminoácido indicados.

Adaptación de 6:2 A/Fujian/411/02

5 Para determinar si la cepa 6:2 A/Fujian podía adaptarse para crecer en huevos de gallina embrionados se amplificó el virus en células MDCK seguido por pase en huevos (tabla 23). Cuando se inocularon 3,0 log<sub>10</sub>ufp de virus en un huevo, se detectaron menos de 2,0 log<sub>10</sub>ufp/ml de virus en el fluido alantoideo extraído. No pudo recuperarse virus infeccioso tras pases de este material. Durante el segundo experimento de pase, se aumentó la cantidad de virus inoculado en huevos de gallina embrionados hasta 5,9 log<sub>10</sub>ufp. Se detectó un título de 3,9 log<sub>10</sub>ufp/ml en el fluido alantoideo extraído (FJ-EP1) y un pase adicional en huevos aumentó el título de virus hasta 6,2 log<sub>10</sub>ufp/ml (FJ-EP2). Un pase adicional en huevos (FJ-EP3) aumentó el título de virus hasta 8,2 log<sub>10</sub>ufp/ml. El análisis de secuencia del virus FJ-EP2 reveló una mutación de A a U en el nt 625 en el segmento de ARN de HA que dio como resultado un cambio H183L en la proteína HA. Un análisis adicional mostró que este cambio también se producía durante la amplificación de virus en células MDCK. También se encontró la mutación H183L en la HA de A/Fujian wt durante su replicación en MDCK y huevos tal como se describió anteriormente. Se encontró una mutación de U a C adicional en el nt 754 de HA que dio como resultado una sustitución V226A en el virus amplificado FJ-EP3 (tabla 23). No se detectaron cambios en el segmento de NA.

15 Para confirmar que las mutaciones H183L y V226A en HA eran de hecho responsables de la replicación aumentada de 6:2 A/Fujian en huevos, se introdujeron H183L y V226A en HA de A/Fujian de manera individual o en combinación. Se obtuvieron tres virus recombinantes y se hicieron crecer hasta un título de 7,4 log<sub>10</sub>ufp/ml para FJ-H183L, 7,9 log<sub>10</sub>ufp/ml para FJ-V226A y 8,4 log<sub>10</sub>ufp/ml para FJ-H183L/V226A (tabla 23). Por tanto, H183L y V226A contribuyeron de manera independiente a la replicación mejorada del virus A/Fujian en huevos de gallina embrionados.

Tabla 23. Mutaciones en la HA de revertientes de 6:2 A/Fujian adaptados a huevo y su replicación en huevos embrionados.

Virus	Mutaciones en el nucleótido (aminoácido)	Títulos de virus(Log <sub>10</sub> ufp/ml)
Sometidos a pases en huevos		
FJ-EP1	ND1	3,9
FJ-EP2	A625U (H183L)	6,2
FJ-EP3	A625U (H183L), U745C (V226A)	8,2
Recombinantes		
FJ-183L	A625T (H183L)	7,4
FJ-226A	T745C (V226A)	7,9
FJ-183L/226A	A625U (H183L), U745C (V226A)	8,4

<sup>1</sup> No determinado.

Propiedades de unión a receptor y replicación de virus recombinantes

25 A partir de los estudios anteriores, se mostró que los cambios de NA que reducían la actividad de NA de A/Fujian eran suficientes para que este virus creciera en huevos. Por otro lado, los cambios de HA (G186V y V226I o H183L y V226A) podrían tener afinidad de unión a receptor aumentada para compensar la mayor actividad de NA de A/Fujian. Para determinar si los cambios en la proteína HA de A/Fujian aumentaban su capacidad de unión a receptor, se compararon la adsorción de 6:2 A/Fujian que llevaba el cambio HA-V186I226 y 6:2 A/Fujian adaptado a huevo que contenía los cambios HA-L183A226 con 6:2 A/Fujian, A/Sendai y A/Wyoming. Se adsorbió cada virus sobre células MDCK a una moi de 1,0 durante 30 min. a 4°C o 33°C, se extrajo el inóculo y se lavaron las células infectadas tres veces o sin la etapa de lavado. Tras 6 h de incubación a 33°C, se determinó el porcentaje de células infectadas mediante análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-NP. Tal como se muestra en la figura 36, 6:2 A/Fujian y A/Sendai infectaron al 26-27% de las células cuando se realizó la adsorción a 4°C, pero la mayoría de los virus se eliminaron fácilmente tras la etapa de lavado. A 33°C, el lavado redujo enormemente la infección del virus 6:2 A/Fujian (el 6,2% en comparación con el 37,8%) pero no tuvo un efecto significativo sobre la infección de 6:2 A/Sendai (el 42,8% en comparación con el 51,7%). En cambio, 6:2 A/Wyoming, A/Fujian con HA-V186I226 o HA-L183A226 tuvieron una tasa de infección similar independientemente de si las células se adsorbieron a 4°C o 33°C y con o sin una etapa de lavado. Estos datos indicaron que HA de A/Fujian y A/Sendai tenía una afinidad de unión tan baja que los virus unidos a 4°C podían eliminarse fácilmente mediante lavado de las células. La unión y la cinética de entrada de virus fueron más rápidas a 33°C, por tanto, la etapa de lavado tenía un impacto mínimo sobre la infección por virus 6:2 A/Sendai. Sin embargo, la mayor parte del 6:2 A/Fujian unido se eliminó mediante lavado en una condición similar porque su actividad de NA superior evitó una unión de virus eficaz a 33°C (datos no mostrados).

Antigenicidad de virus recombinantes



5 Para examinar si los virus con los residuos de HA y NA modificados afectaban a la antigenicidad de virus, se realizó un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) usando sueros de hurón anti-A/Wyoming y anti-A/Sendai (tabla 24). Los sueros de hurón anti-A/Wyoming o anti-A/Sendai tenían un título de HAI similar cuando se midió con virus o bien 6:2 A/Fujian o bien A/Sendai. Se detectó un título de HAI ligeramente superior con virus 6:2 A/Wyoming, probablemente debido a la unión más estrecha de HA de A/Wyoming al receptor celular en los glóbulos rojos. Los dos virus modificados (A/FujianHA-V186I226 y A/Fujian HA-L183A226) tenían un título de HAI similar a A/Wyoming cuando se midieron mediante cualquier suero. Estos resultados indicaron que la diferencia de aminoácidos entre A/Sendai y A/Wyoming y los virus de HA modificada generados en este estudio no alteró la antigenicidad de virus.

Tabla 24. Antigenicidad de virus 6:2 A/Fujian modificados

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

<sup>(1)</sup> Se hizo crecer A/Fujian en células MDCK y se hicieron crecer el resto de los virus en huevos.

<sup>(2)</sup> Se midió la antigenicidad mediante ensayo de HAI usando suero de hurón inmunizado frente a A/Wyoming (anti-A/WY) o frente a A/Sendai (anti-A/SD) con los antígenos de virus indicados

10 Estudios adicionales: *G186V* y *A196T* en la proteína HA, lo que aumenta la capacidad de virus para unirse a los receptores celulares, aumentan la replicación de virus en huevos

15 Tal como se indicó anteriormente, puede mejorarse la escasa replicación de A/Fujian/411/02 (A/Fujian) en huevos de gallina embrionados sustituyendo residuos de aminoácido en la región de unión al receptor de la molécula de HA. Para someter a prueba si este enfoque puede aplicarse a una cepa de H3N2 reciente, se investigó la capacidad de A/Singapore/21/04 (A/Singapore, obtenido del CDC, Atlanta, GA), que está antigénicamente relacionado con la cepa de vacuna A/California/7/04 (A/California), para crecer en huevos. Se amplificaron la HA y NA de A/Wyoming/03/03 (A/Wyoming, una cepa de tipo A/Fujian adaptada a huevos), A/California y A/Singapore mediante RT-PCR y se clonaron en un plásmido de expresión pAD3000. Se generaron virus reordenantes 6:2 con los seis genes internos de A/Ann Arbor/6/60 adaptado al frío, el virus donador maestro (VDM-A) para los componentes de vacuna de influenza A de la vacuna Flumist®. Se compararon los residuos de aminoácido en la región de unión a receptor de HA de estas cepas y se evaluaron para determinar sus efectos sobre la replicación de virus y la antigenicidad.

*Comparación de secuencias de HA y sus propiedades de replicación de A/Singapore, A/California y A/Wyoming.*

25 La diferencia en los residuos de aminoácido en el sitio de unión a receptor de HA de estas cepas de H3N2 se resume en la tabla 25. El residuo 1266, que se ha mostrado que es crítico para replicación de virus en huevos, es idéntico entre todas estas cepas. Sin embargo, A/Singapore se diferencia de A/California y A/Wyoming en dos posiciones: 186 y 196.

30 Los tres virus tenían propiedades de crecimiento similares en células MDCK, alcanzando títulos de ~7,0 log<sub>10</sub>ufp/ml. Tanto A/California como A/Wyoming crecieron bien en huevos (~9,0 log<sub>10</sub>ufp/ml); sin embargo, A/Singapore creció escasamente en huevos con un título de tan sólo 2,1 log<sub>10</sub>ufp/ml (tabla 1). Los reordenantes 6:2 contenían los seis genes internos de la cepa A/Ann Arbor/6/60 adaptada al frío (VDM-A) y las HA y NA de estas tres cepas de H3N2 wt se replicaron de manera similar a la wt correspondiente tanto MDCK como en huevos (tabla 25), lo que indica que la transferencia de los segmentos génicos de HA y NA wt en VDM-A no cambió su replicación.

Tabla 25. Comparación de la secuencia de HA y replications virales de cepas de H3N2 recientes.

Virus	Residuos de HA			Título de virus (media de log <sub>10</sub> ufp/ml ± EE) <sup>(1)</sup>			
	186	196	226	MDCK		Huevo	
				wt	6:2	wt	6:2
A/Wyoming/03/03	V	A	I	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,4	8,9 ± 0,3	8,1 ± 0,1
A/California/07/04	G	T	I	7,0 ± 0,3	7,5 ± 0,3	8,1 ± 0,6	8,5 ± 0,6
A/Singapore/21/04	G	A	I	7,1 ± 0,3	7,5 ± 0,5	2,1 ± 0,6	<1,5
A/Sing-G186V	V	A	I	n/a <sup>(2)</sup>	7,2 ± 0,3	n/a	8,0 ± 0,6
A/Sing-A196T	G	T	I	n/a	7,2 ± 0,5	n/a	8,5 ± 0,2

<sup>(1)</sup> Los títulos de virus se expresan como media log<sub>10</sub>ufp/ml ± error estándar a partir de dos o más experimentos.  
n/a = no aplicable.

*Efectos de residuos de HA sobre la replicación de virus.*

35 Se investigaron los residuos HA-186 y HA-196 que se diferenciaban entre A/Singapore, A/Wyoming y A/California para determinar sus papeles en la replicación de virus. Se introdujeron las mutaciones de sustitución en uno cualquiera de estos dos sitios en ADNc de HA de A/Singapore y se introdujeron los plásmidos de HA modificada en

VDM-A junto con el plásmido de NA de A/Singapore. Los virus reordenantes 6:2 recuperados que llevaban una mutación de sustitución en cada sitio, se replicaron eficazmente en huevos de gallina embrionados, alcanzando un título de 8,0 y 8,5 log<sub>10</sub> UFP/ml, respectivamente (tabla 25). Por tanto, un cambio de un único aminoácido en el sitio o bien 186 o bien 196 era suficiente para permitir que 6:2 A/Singapore creciera eficazmente en huevos.

5 *Eficacia de unión a receptor de recombinantes 6:2 en células MDCK.*

Dado que ambos de los residuos 186 y 196 están situados en la región de unión a receptor de HA (véase, Weis *et al.*, Nature 1988;333:426-31), se comparó la unión de virus reordenantes 6:2 que contenían G186V o A196T a células MDCK con la de los virus wt. Se infectaron células MDCK en placas de seis pocillos o bien con los virus wt o bien con los dos recombinantes modificados a una moi de 1,0 durante 30 min. a 4°C, se lavaron tres veces con PBS, se recubrieron con 2 ml de Opti-MEM I y se incubaron a 33°C durante 6 h. Entonces se fijó la monocapa de células con paraformaldehído al 1%, se permeabilizó con el 0,2% de Triton X-100 en PBS, y se inmunotizó con anticuerpos monoclonales anti-NP. Se calculó el porcentaje de las células infectadas y se expresó como eficacia de unión. A/Singapore tenía una eficacia de unión muy escasa del 5%, en comparación con A/Wyoming (56%) o A/California (60%). Al contrario que A/Singapore wt, los dos virus modificados, A/Sing-G186V o A/Sing-A196T, tenían una eficacia de unión significativamente aumentada (55-60%).

*Antigenicidad de virus recombinantes*

Para examinar si los virus con los residuos de HA y NA modificados afectaban a la antigenicidad de virus, se realizó un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) usando sueros de hurón anti-A/Wyoming y anti-A/California (tabla 26). Se incubaron alícuotas de 25 ul de antisueros de hurón diluidos en serie 2 veces con 25 µl (4 HAU) de virus reordenantes 6:2 a 37°C durante 1 h seguido por incubación con 50 ul de glóbulos rojos de pavo al 0,5% a 25°C durante 45 min. Se definió el título de HAI como la mayor dilución de suero que inhibió la hemaglutinación. Basándose en el ensayo de HAI, se mostró que A/Singapore estaba estrechamente relacionado con A/California, pero era 2 veces diferente de A/Wyoming. Los dos virus modificados (A/Sing-G186V y A/Sing- A196T) tenían los títulos de HAI iguales a A/Singapore o A/California usando cualquier suero. Estos resultados indicaron que los virus modificados de HA generados en este estudio no alteraron la antigenicidad de virus.

**Tabla 26.** Antigenicidad de virus 6:2 A/Singapore modificados.

Virus	Antigenicidad (HAI) <sup>(1)</sup>	
	anti-A/Wyoming	anti-A/California
A/Wyoming	4096	2048
A/California	2048	4096
A/Singapore	2048	2048
A/Sing-G196V	2048	4096
A/Sing-A196T	2048	4096

<sup>(1)</sup> Se midió la antigenicidad mediante ensayo de HAI usando suero de hurón anti-A/Wyoming o anti-A/California inmunizado con virus reordenantes 6:2.

**EJEMPLO 12: DETERMINACIÓN DE LOS LOCI QUE CONTROLAN EL FENOTIPO ADAPTADO AL FRÍO DEL VIRUS INFLUENZA B/ANN ARBOR/1/66**

B/Ann Arbor/1/66 adaptado al frío (ca) es el virus donador maestro (VDM-B) para las vacunas Flumist® de influenza B atenuadas vivas. Las vacunas de 6:2 influenza B que llevan los seis genes internos derivados de B/Ann Arbor/1/66 ca y las glicoproteínas de superficie HA y NA de las cepas de tipo natural recombinantes se caracterizan por los fenotipos adaptado al frío (ca), sensible a la temperatura (ts) y atenuado (att). El análisis de secuencia reveló que VDM-B contiene nueve aminoácidos en las proteínas PB2, PA, NP y M1 que no se encuentran en cepas de influenza B de tipo natural. Se ha determinado que tres aminoácidos en PA(M431V) y NP(A114V, H410P) determinaban el fenotipo ts y, además de estos tres loci de ts, dos aminoácidos en M1 (Q159H, V183M) conferían el fenotipo att.

Para entender la base molecular del fenotipo ca, se usó el sistema genético inverso basado en plásmido para evaluar la contribución de estos nueve aminoácidos específicos de VDM-B al fenotipo ca. VDM-B recombinante se replicó eficazmente a 25°C y 33°C en las células de riñón embrionario de pollo (CEK). En cambio, B/Ann Arbor/ 1/66 de tipo natural recombinante, que contenía los nueve aminoácidos de tipo natural, se replicó de manera ineficaz a 25°C. Se determinó que se requería un total de cinco aminoácidos de tipo natural, uno en PB2 (R630S), uno en PA(M431V) y tres en NP(A114V, H410P, T509A), para revertir completamente el fenotipo ca de VDM-B. Además, sustituir dos aminoácidos en la proteína M1 (Q159H, V183M) de VDM-B o cepas de vacuna 6:2 por los aminoácidos de tipo natural aumentó significativamente la replicación de virus a 33°C pero no a 25°C en células CEK; el cambio V183M tenía un impacto mayor sobre el cambio.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de aumento de la replicación de un virus influenza A reordenante en al menos el 10%, comprendiendo el método las etapas de:
    - a) introducir una sustitución de aminoácido en la secuencia de HA del virus reordenante, produciendo de ese modo un virus reordenante alterado, en el que la sustitución de aminoácido es treonina en la posición 196; y
    - b) hacer crecer el virus reordenante alterado en huevos.
- 5

# pAD3000 (SEQ ID NO:94)

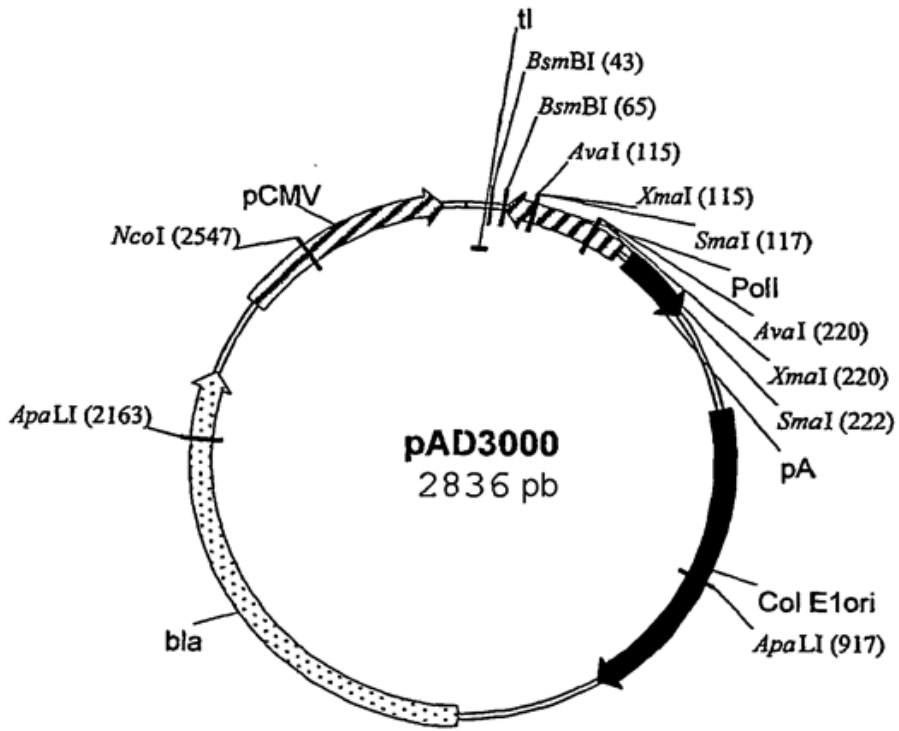


Fig. 1

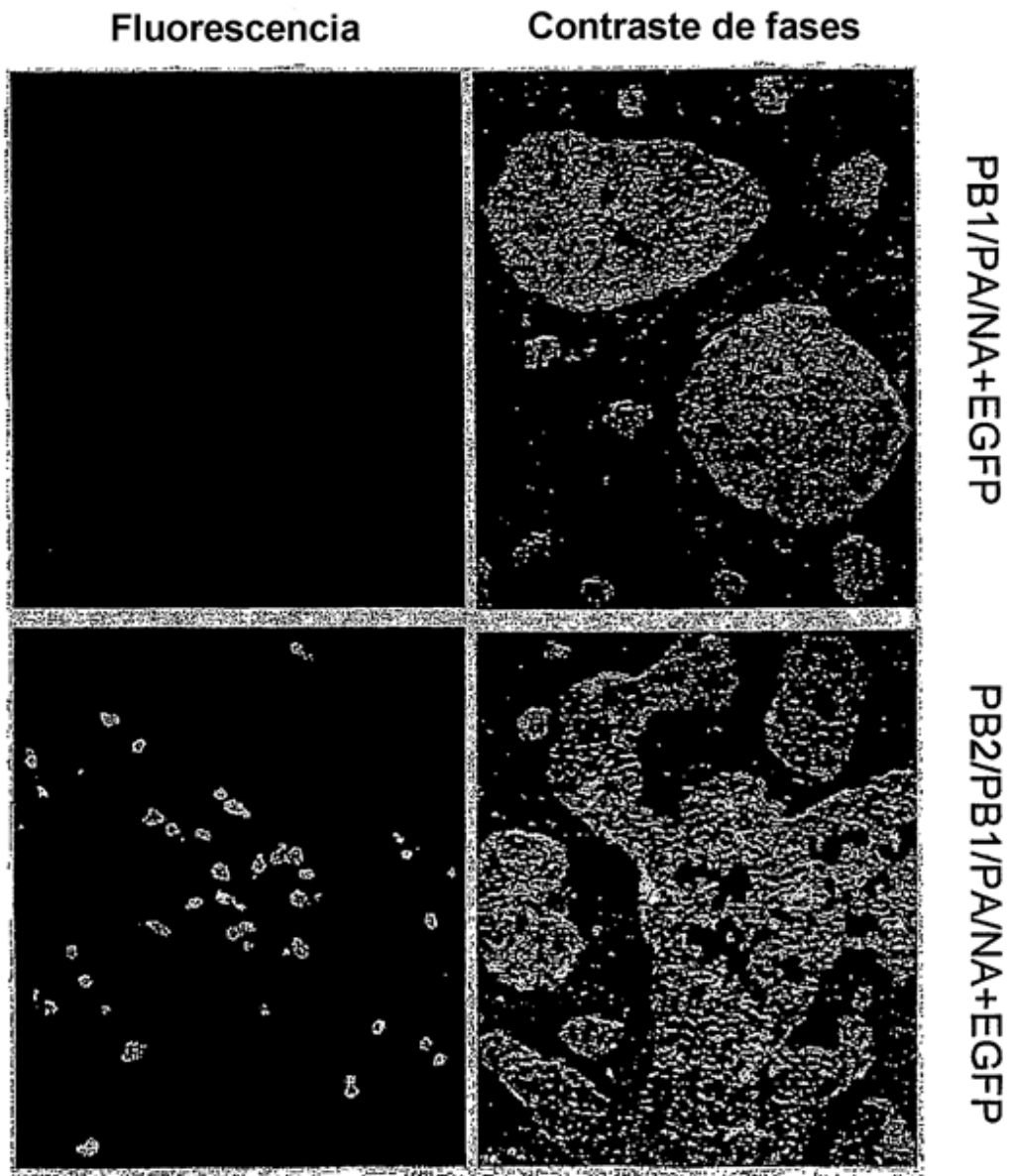


Fig. 2

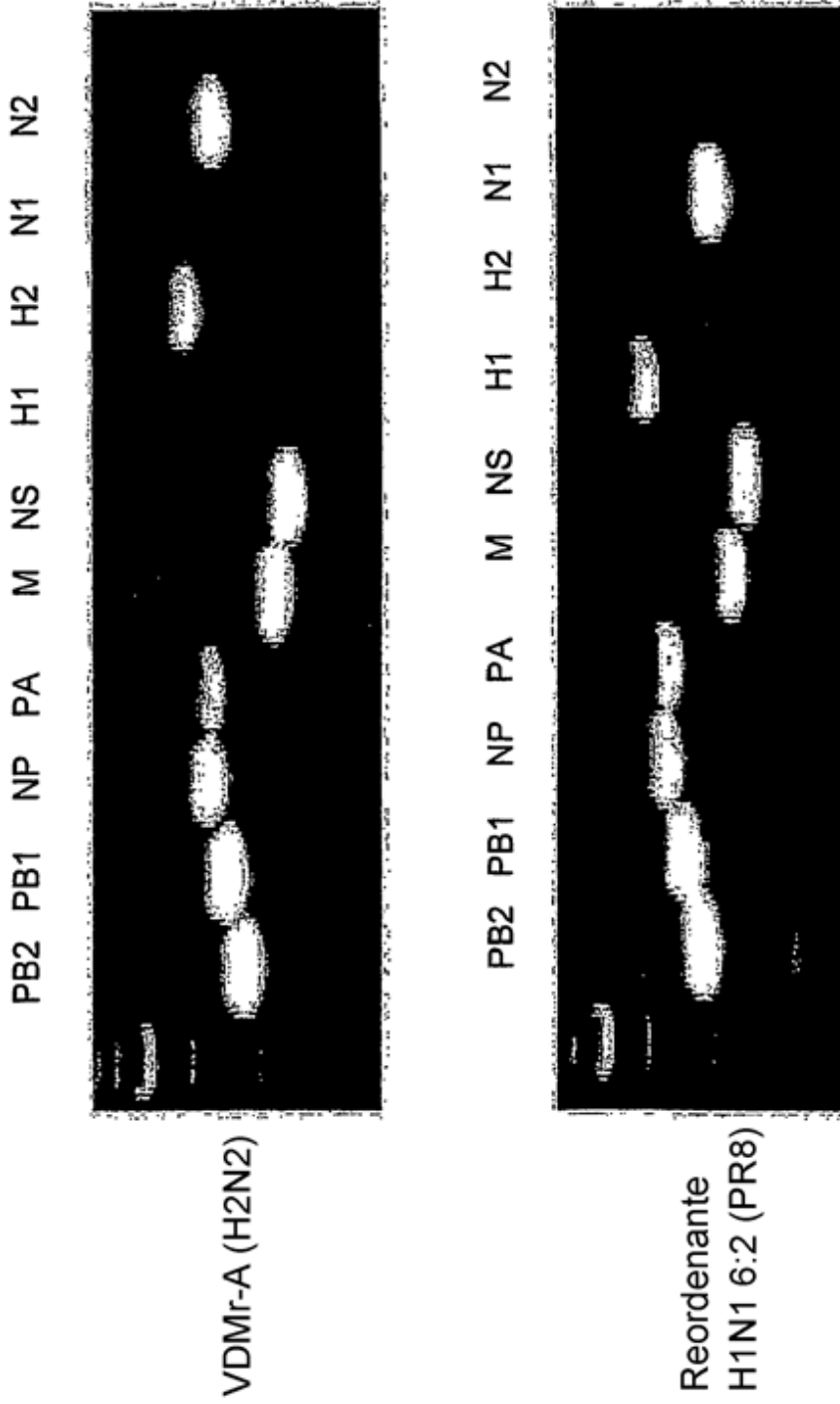


Fig. 3

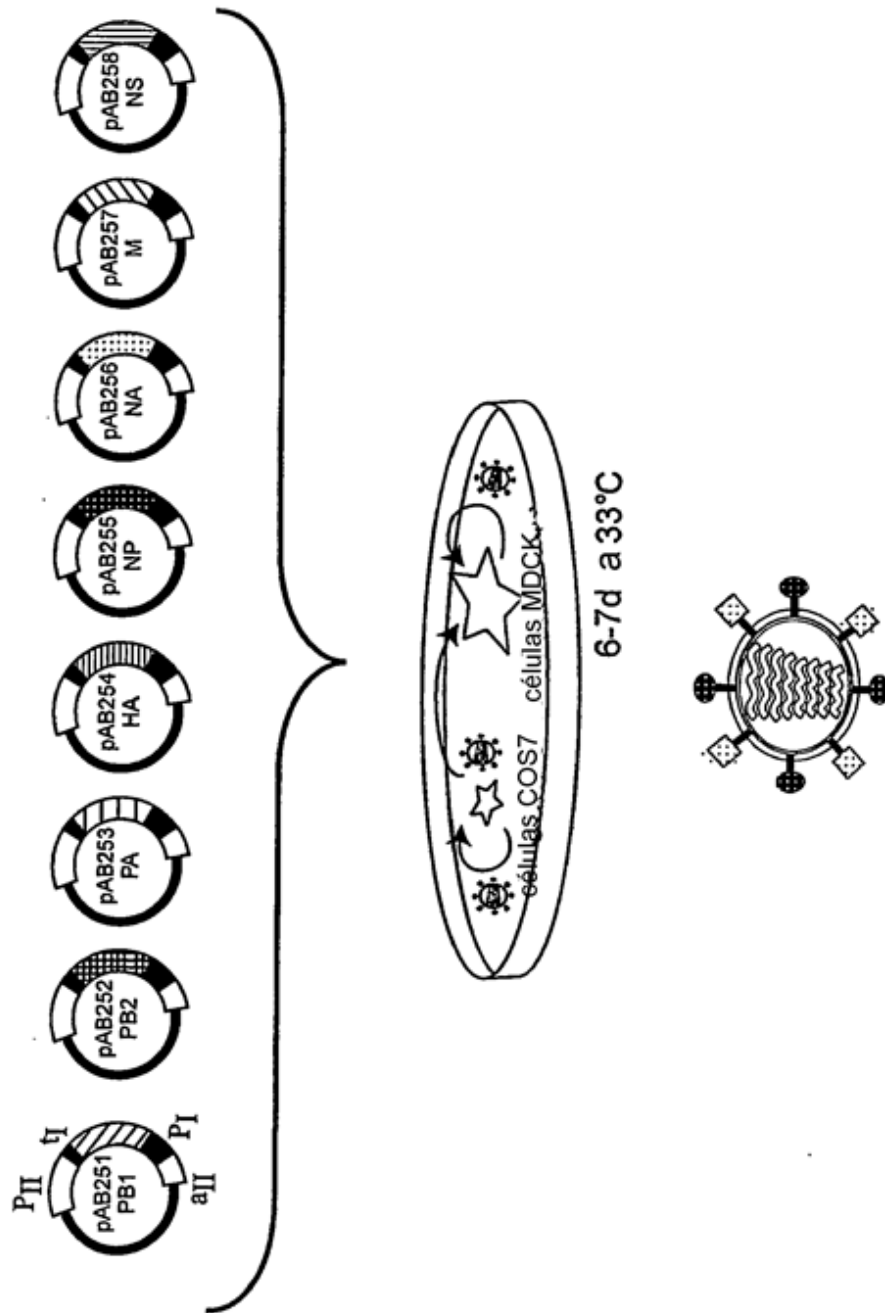
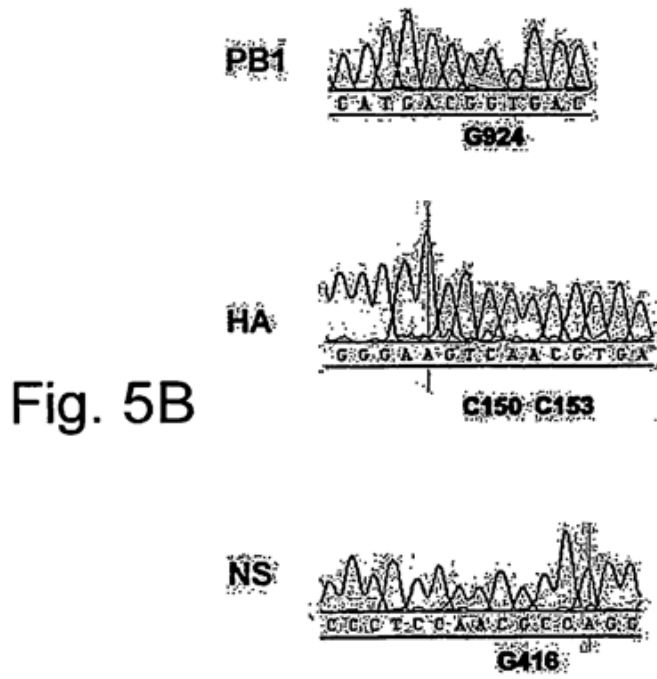
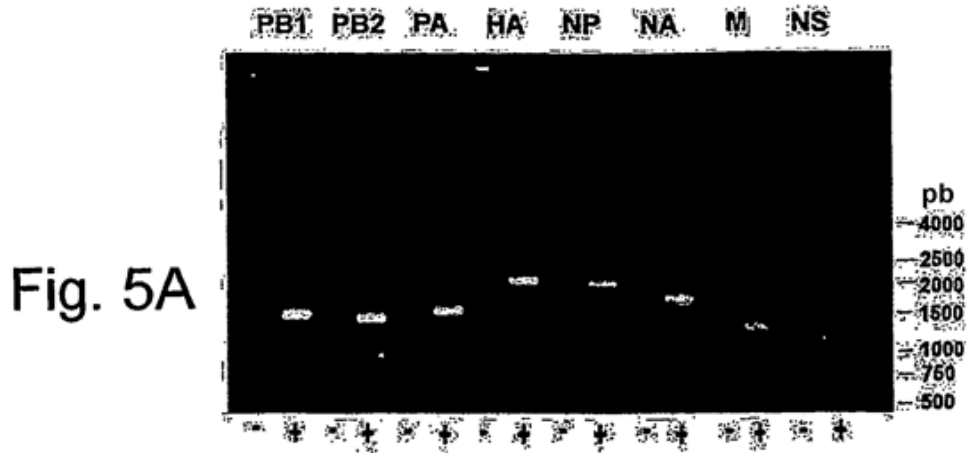


Fig. 4





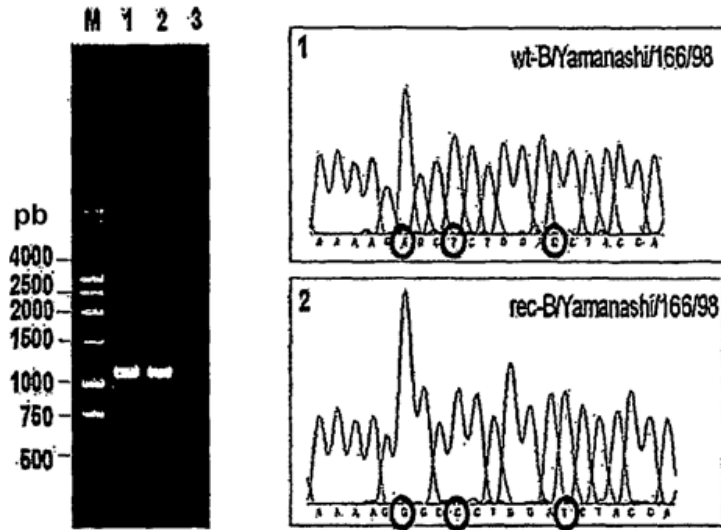


Fig. 5C

Fig. 5D

## 2. Secuencia en formato Genbank

LOCUS	pAD3000	2836	ADN circular	14 de enero de 2002
DEFINICIÓN	Derivado de pHW2000 con señal de poliA de SV40 que reemplaza a BGH			
CARACTERÍSTICAS	<b>Ubicación/calificadores</b>			
promotor	2420..2799	/vntifkey="29"		
		/etique.=pCMV		
		/nota="promotor de CMV truncado (correspondiente a la región 484-863 de pcDNA3)"		
misc_marcador	1422..2282	/vntifkey="22"		
		/etique.=bla		
		/nota="beta lactamasa"		
rep_origen	612..1172	/vntifkey="33"		
		/etique.=Col\E1ori		
		/nota="origen de replicación Col E1"		
terminador	11..45	/vntifkey="43"		
		/etique.=tI		
		/nota="terminador de Pol I"		
promotor	complemento (65..276)	/vntifkey="29"		
		/etique.=PolI		
		/nota="promotor de Pol I humana"		
exón	296..430	/vntifkey="61"		
		/etique.=pA		
		/nota="pA (SV40)"		
RECuento DE BASES	717 a	734 c	703 g	682 t
ORIGEN	<pre> 1 ctagcagtta accggagtac tggctgacct ccgaagttgg gggggaggag acggtaccgt 61 ctccaataac cggcgggccc aaaatgccga ctcggagcga aagatatacc tccccggggg 121 cggggaggtc gctcaccga ccacgcgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg 181 tccccaaaaa cgccaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggtaaccc 241 caggacacac gcgggagcag cgccgggccc gggacgccct cccggcggtc acctcagaca 301 tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct 361 ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac cattataagc tgcaataaac 421 aaggatctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg 481 tcttccgctt cctcgcctac tgactcgtg cgctcggctg ttcggctgcg gcgagcggta 541 tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag 601 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 661 tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaana atcgacgctc aagtcagagg 721 tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgttc cccctggaag ctcctcgtg 781 cgctctcctg tcccgaccct gccgctacc ggatacctgt ccgcctttct ccctcggga 841 agcgtggcgc tttctcaatg ctacgcgtgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc 901 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt 961 aactatcgte ttgagtccaa cccggtaga cagacttat cgccactggc agcagccact 1021 ggtaacagga ttgacagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg 1081 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 1141 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 1201 ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 1261 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggatttt 1321 gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagttt </pre>			

Fig. 6

```

1381 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt
1441 gaggcaccta tctcagegat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgctc
1501 gtgtagataa ctacgatagc ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataaccg
1561 cgagaccacac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaagggcc
1621 gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg
1681 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttg c cattgctaca
1741 ggcacgtggg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga
1801 tcaaggcgag ttacatgac ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcgggtcct
1861 ccgatcggtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggtat ggcagcactg
1921 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca
1981 accaagtcac tctgagaata gtgtatgceg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata
2041 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct
2101 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact
2161 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa
2221 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggg ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc
2281 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg
2341 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttcccga
2401 aaagtgccac ctgacgtcga tatgccaaat acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa
2461 tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac
2521 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg
2581 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg
2641 agtttgttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccca
2701 ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg
2761 ctaactagag aaccactgc ttactggctt atcgaatta atacgactca ctatagggag
2821 acccaagctg ttaacg

```

'/

Fig. 6 Cont.

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

(SEQ ID NO: 95-102)

<u>PB1</u>					
		*	20	*	40
pAB121-PB1	:	.....		.....	50
MDV-B-PB1	:	.....		.....	50
		AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATGAATATAAATCCTTATTTTCTTTCAT			
			60	*	80
pAB121-PB1	:	.....		.....	100
MDV-B-PB1	:	.....		.....	100
		AGATGTACCCATACAGGCAGCAATTTCAACAACATTCCCATACACCGGTG			
			*	120	*
pAB121-PB1	:	.....		.....	150
MDV-B-PB1	:	.....		.....	150
		TTCCCCCTTATTTCCCATGGAACGGGAACAGGCTACACAATAGACACCGTG			
			160	*	180
pAB121-PB1	:	.....		.....	200
MDV-B-PB1	:	.....		.....	200
		ATTAGAACACATGAGTACTCAAACAAGGGAAAACAATACATTTCTGATGT			
			*	220	*
pAB121-PB1	:	.....		.....	250
MDV-B-PB1	:	.....		.....	250
		TACAGGATGTGCAATGGTAGATCCAACAATGGGCCATTACCCGAAGATA			
			260	*	280
pAB121-PB1	:	.....		.....	300
MDV-B-PB1	:	.....		.....	300
		ATGAGCCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGCGTTCTGGAGGCTTGGAT			
			*	320	*
pAB121-PB1	:	.....		.....	350
MDV-B-PB1	:	.....		.....	350
		AGAATGGATGAAGAACATCCAGGTCTGTTTCAAGCAGCCTCACAGAATGC			
			360	*	380
pAB121-PB1	:	.....		.....	400
MDV-B-PB1	:	.....		.....	400
		CATGGAGGCACTAATGGTCACAACCTGTAGACAAATTAACCCAGGGGAGAC			
			*	420	*
pAB121-PB1	:	.....		.....	450
MDV-B-PB1	:	.....		.....	450
		AGACTTTTGATTGGACAGTGTGCAGAAACCAACCTGCTGCAACGGCACTG			
			460	*	480
pAB121-PB1	:	.....		.....	500
MDV-B-PB1	:	.....		.....	500
		AACACAACAATAACCTCTTTTAGGTTGAATGATTTGAATGGAGCCGACAA			

Fig. 7

```

                *      520      *      540      *
pAB121-PB1 : ..... : 550
MDV-B-PB1  : ..... : 550
                GGGTGGATTAGTACCCTTTGCCAAGATATCATTGATTCATTGGACAAAC

                560      *      580      *      600
pAB121-PB1 : ..... : 600
MDV-B-PB1  : ..... : 600
                CTGAAATGACTTTCTTCTCGGTAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGCT

                *      620      *      640      *
pAB121-PB1 : ..... : 650
MDV-B-PB1  : ..... : 650
                AAAAACAGAAAGGGTTTCTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGA

                660      *      680      *      700
pAB121-PB1 : ..... : 700
MDV-B-PB1  : ..... : 700
                CAGAATAACCAGAGTGAATACATCAAAAGAGCATTATCATTAAACACAA

                *      720      *      740      *
pAB121-PB1 : ..... : 750
MDV-B-PB1  : ..... : 750
                TGACAAAAGATGCTGAAAGAGGCCAAACTAAAAAGAAGAGCAATTGCCACC

                760      *      780      *      800
pAB121-PB1 : ..... : 800
MDV-B-PB1  : ..... : 800
                GCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAA

                *      820      *      840      *
pAB121-PB1 : ..... : 850
MDV-B-PB1  : ..... : 850
                AAATATCTGTGAAAATCTAGAACAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACG

                860      *      880      *      900
pAB121-PB1 : ..... : 900
MDV-B-PB1  : ..... : 900
                AGAAGAAGGCCAAACTGTCAATGCAGTGGCCAAAATGCTCAGTAACTGC

                *      920      *      940      *
pAB121-PB1 : .....G..... : 950
MDV-B-PB1  : ..... : 950
                CCACCAGGAGGGATCAGCATGACAGTGACAGGAGACAATACTAAATGGAA

                960      *      980      *      1000
pAB121-PB1 : ..... : 1000
MDV-B-PB1  : ..... : 1000
                TGAATGCTTAAATCCAAGAATCTTTTTGGCTATGACTGAAAGAATAACCA

                *      1020      *      1040      *
pAB121-PB1 : ..... : 1050
MDV-B-PB1  : ..... : 1050
                GAGACAGCCCAATTTGGTTCGGGATTTTGTAGTATAGCACCGGTCTTG

                1060      *      1080      *      1100

```

Fig. 7 Cont.

```

pAB121-PB1 : ..... : 1100
MDV-B-PB1  : ..... : 1100
            TTCTCCAATAAAATAGCCAGATTGGGAAAAGGGTTCATGATAACAAGCAA
                *      1120      *      1140      *

pAB121-PB1 : ..... : 1150
MDV-B-PB1  : ..... : 1150
            AACAAAAAGACTGAAGGCTCAAATACCTTGTCCCGATCTGTTTAATATAC
                1160      *      1180      *      1200

pAB121-PB1 : ..... : 1200
MDV-B-PB1  : ..... : 1200
            CATTAGAAAGATATAATGAAGAAACAAGGGCAAATTAATAAAGCTGAAA
                *      1220      *      1240      *

pAB121-PB1 : ..... : 1250
MDV-B-PB1  : ..... : 1250
            CCATTCTTCAATGAAGAAGGAACGGCATCTTTGTGCGCTGGGATGATGAT
                1260      *      1280      *      1300

pAB121-PB1 : ..... : 1300
MDV-B-PB1  : ..... : 1300
            GGAATGTTAATATGCTATCTACCGTGTGGGAGTAGCCGCACTAGGGA
                *      1320      *      1340      *

pAB121-PB1 : ..... : 1350
MDV-B-PB1  : ..... : 1350
            TCAAAAACATTGGAACAAGAATACTTATGGGATGGACTGCAATCTTCT
                1360      *      1380      *      1400

pAB121-PB1 : ..... : 1400
MDV-B-PB1  : ..... : 1400
            GATGATTTGCTCTGTTTGTAAATGCAAAGATGAAGAGACATGTATGGA
                *      1420      *      1440      *

pAB121-PB1 : ..... : 1450
MDV-B-PB1  : ..... : 1450
            AGGAATAAACGATTTTACCGAACATGTAAGCTATTGGGAATAAACATGA
                1460      *      1480      *      1500

pAB121-PB1 : ..... : 1500
MDV-B-PB1  : ..... : 1500
            GCAAAAAGAAAAGTTACTGTAATGAACTGGAATGTTGAATTTACAAGC
                *      1520      *      1540      *

pAB121-PB1 : ..... : 1550
MDV-B-PB1  : ..... : 1550
            ATGTTCTACAGAGATGGATTTGTATCTAATTTGCAATGGAACCTCCTTC
                1560      *      1580      *      1600

pAB121-PB1 : ..... : 1600
MDV-B-PB1  : ..... : 1600
            ATTTGGAGTTGCTGGAGTAAATGAATCAGCAGATATGGCAATAGGAATGA
    
```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

                2160      *      2180      *      2200

```

Fig. 7 Cont.

```

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

           *      2220      *      2240      *
pAB121-PB1 : ..... : 2250
MDV-B-PB1  : ..... : 2250
           TAGATTATGAATCAGGAAGAATGTCAAAGGATGATTTGAGAAAGCAATG

           2260      *      2280      *      2300
pAB121-PB1 : ..... : 2300
MDV-B-PB1  : ..... : 2300
           GCTCACCTTGGTGAGATTGGGTACATATAAGCTTCGAAGATGTCTATGGG

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

           2360
pAB121-PB1 : ..... : 2369
MDV-B-PB1  : ..... : 2369
           AAAGGCTCGTGTCTACT
    
```

Fig. 7 Cont.



```

PB2
      *      20      *      40      *
pAB122-PB2 : ..... : 50
MDV-B-PB2  : ..... : 50
          AGCAGRAGCGGAGCGTTTTCAAGATGACATTGGCCAAAATTGAATTGTTA

      60      *      80      *      100
pAB122-PB2 : ..... : 100
MDV-B-PB2  : ..... : 100
          AAACAACCTGTTAAGGGACAATGAAGCCAAAACGGTATTGAAACAAAACAAC

      *      120     *      140     *
pAB122-PB2 : ..... : 150
MDV-B-PB2  : ..... : 150
          GGTAGACCAATATAACATAATAAGAAAATTCATACATCAAGAATTGAAA

      160     *      180     *      200
pAB122-PB2 : ..... : 200
MDV-B-PB2  : ..... : 200
          AGAACCCCTTCATTAAGGATGAAGTGGGCCATGTGTCTAATTTCCCTTG

      *      220     *      240     *
pAB122-PB2 : ..... : 250
MDV-B-PB2  : ..... : 250
          GCTCTGACCAAGGGTGATATGGCAAATAGAATCCCCTTGAATACAAGGG

      260     *      280     *      300
pAB122-PB2 : ..... : 300
MDV-B-PB2  : ..... : 300
          AATACAACCTTAAAACAAATGCTGAAGACATAGGAACCAAAGGCCAAATGT

      *      320     *      340     *
pAB122-PB2 : ..... : 350
MDV-B-PB2  : ..... : 350
          GCTCAATAGCAGCAGTTACCTGGTGGAAATACATATGGACCAATAGGAGAT

      360     *      380     *      400
pAB122-PB2 : ..... : 400
MDV-B-PB2  : ..... : 400
          ACTGAAGGTTTCGAAAAGGTCTACGAAAGCTTTTTTCTCAGAAAGATGAG

      *      420     *      440     *
pAB122-PB2 : ..... : 450
MDV-B-PB2  : ..... : 450
          ACTTGACAATGCCACTTGGGGCCGAATAACTTTTGGCCCAGTTGAAAGAG

      460     *      480     *      500
pAB122-PB2 : ..... : 500
MDV-B-PB2  : ..... : 500
          TGAGAAAAAGGGTACTGCTAAACCTCTCACCAAGGAAATGCCTCCAGAT

      *      520     *      540     *
pAB122-PB2 : ..... : 550
MDV-B-PB2  : ..... : 550
          GAAGCGAGCAATGTGATAATGGAATATTGTTCCCTAAAGAAGCAGGAAT

      560     *      580     *      600

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1660      *      1680      *      1700

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          2160      *      2180      *      2200
pAB122-PB2 : ..... : 2200
MDV-B-PB2  : ..... : 2200
          GATTTCAAAGCTATTGAAGAAGCTGAAAAGCTAAAACCGGGGAAAAAGC
    
```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

                2360      *      2380      *
pAB122-PB2 : ..... : 2396
MDV-B-PB2  : ..... : 2396
                TTAATTC AATAGACACAATTGAGTGAAAAATGCTCGTGTTC TACT
    
```

Fig. 7 Cont.

PA					
		*	20	*	40
pAB123-PA :	.....				50
MDV-B-PA :	.....				50
		AGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTGCCATAATGGATACTTTTATTACAAGA			
		60	*	80	*
pAB123-PA :	.....				100
MDV-B-PA :	.....				100
		AACTTCCAGACTACAATAATACAAAAGGCCAAAAACACAATGGCAGAATT			
		*	120	*	140
pAB123-PA :	.....				150
MDV-B-PA :	.....				150
		TAGTGAAGATCCTGAATTACAACCAGCAATGCTATTCAACATCTGCGTCC			
		160	*	180	*
pAB123-PA :	.....				200
MDV-B-PA :	.....				200
		ATCTGGAGGTCTGCTATGTAATAAGTGATATGAATTTTCTTGATGAAGAA			
		*	220	*	240
pAB123-PA :	.....				250
MDV-B-PA :	.....				250
		GGAAAAACATATACAGCATTAGAAGGACAAGGAAAAAGAACAAAACCTTGAG			
		260	*	280	*
pAB123-PA :	.....				300
MDV-B-PA :	.....				300
		ACCACAATATGAAGTGATTGAGGGAATGCCAAGAAACATAGCATGGATGG			
		*	320	*	340
pAB123-PA :	.....				350
MDV-B-PA :	.....				350
		TTCAAAGATCCTTAGCCAAGAGCATGGAATAGAGACTCCAAGGTATCTG			
		360	*	380	*
pAB123-PA :	.....				400
MDV-B-PA :	.....				400
		GCTGATTTGTTTCGATTATAAAACCAAGAGGTTTATAGAAGTTGGAATAAC			
		*	420	*	440
pAB123-PA :	.....				450
MDV-B-PA :	.....				450
		AAAGGGATTGGCTGACGATTACTTTTGGAAAAAGAAAGAAAAGCTGGGGA			
		460	*	480	*
pAB123-PA :	.....				500
MDV-B-PA :	.....				500
		ATAGCATGGAACTGATGATATTCAGCTACAATCAAGACTATTCGTTAAGT			
		*	520	*	540
pAB123-PA :	.....				550
MDV-B-PA :	.....				550
		AATGAATCCTCATTGGATGAGGAAGGAAAAGGGAGAGTGCTAAGCAGACT			
		560	*	580	*
pAB123-PA :	.....				600

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1060      *      1080      *      1100
pAB123-PA : ..... : 1100
MDV-B-PA : ..... : 1100
          GGGACTGTGTAATACAATAAGTAATGAGGAAACAAGTAACGAATTACAG
    
```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

                1660      *      1680      *      1700

```

Fig. 7 Cont.



```

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

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

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

          *      1820      *      1840      *
pAB123-PA : ..... : 1850
MDV-B-PA  : ..... : 1850
          AATCATCGATACAAGGATATGACATGACCAAAGCTTGTTC AAGGGAGAC

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

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

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

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

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

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

          2160      *      2180      *      2200
pAB123-PA : ..... : 2200
MDV-B-PA  : ..... : 2200
          GGCTTTGAAAAGAGGGGAGTAAAGTATTAGAAATCAATAGATGAAATAAT
    
```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

Fig. 7 Cont.

HA					
			*	20	*
				40	*
MDV-B-HA	:	.....			50
pAB124-HA	:	.....			50
		AGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGT			
			60	*	80
				*	100
MDV-B-HA	:	.....			100
pAB124-HA	:	.....			100
		ACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAA			
			*	120	*
				140	*
MDV-B-HA	:	.....			150
pAB124-HA	:	.....			150
		CATCGTCAAACCTCACCCCATGTGGTCAAACCTGCTACTCAAGGGGAAGTC			
			160	*	180
				*	200
MDV-B-HA	:	.....			200
pAB124-HA	:	.....			200
		AACGTGACTGGTGTGATACCACTGACAACAACACCTACCAAATCTCATT			
			*	220	*
				240	*
MDV-B-HA	:	.....			250
pAB124-HA	:	.....			250
		TGCAAATCTCAAAGGAACACAGACCAGAGGGAAACTATGCCCAAACCTGTC			
			260	*	280
				*	300
MDV-B-HA	:	.....			300
pAB124-HA	:	.....			300
		TCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAAGTGTATGGGG			
			*	320	*
				340	*
MDV-B-HA	:	.....			350
pAB124-HA	:	.....			350
		ACCATACCTTCGGCAAAGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTAC			
			360	*	380
				*	400
MDV-B-HA	:	.....			400
pAB124-HA	:	.....			400
		ATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAATAATCAGACAGCTAC			
			*	420	*
				440	*
MDV-B-HA	:	.....			450
pAB124-HA	:	.....			450
		CCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAGCCCCTAACGTT			
			460	*	480
				*	500
MDV-B-HA	:	.....			500
pAB124-HA	:	.....			500
		ATCAACGCAGAAACGGCACCAGGAGGACCTACATAGTTGGAACCTCAGG			
			*	520	*
				540	*
MDV-B-HA	:	.....			550
pAB124-HA	:	.....			550
		ATCTTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAAGGATTCTTCGCAACAATGGCTT			
			560	*	580
				*	600
MDV-B-HA	:	.....			600

Fig. 7 Cont.

```

pAB124-HA : ..... : 600
          GGGCTGTCCCAAAAACAACAAAACCAAAACAGCAACGAACCCATTAACA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1060      *      1080      *      1100
MDV-B-HA : ..... : 1100
pAB124-HA : ..... : 1100
          GTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGRACCAAATATAGACCTCCTGC
    
```

Fig. 7 Cont.

```

          *      1120          *      1140          *
MDV-B-HA : ..... : 1150
pAB124-HA : ..... : 1150
          AAAACTATTAAAGGAAAGGGCTTCTTCGGAGCTATGCTGGTTCTTGG

          1160          *      1180          *      1200
MDV-B-HA : ..... : 1200
pAB124-HA : ..... : 1200
          AAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCAT

          *      1220          *      1240          *
MDV-B-HA : ..... : 1250
pAB124-HA : ..... : 1250
          GGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCAGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGC

          1260          *      1280          *      1300
MDV-B-HA : ..... : 1300
pAB124-HA : ..... : 1300
          TATAAACCAAGATAACRAAAAATCTCAATTCTTTAAGTGAGCTAGAAAGTAA

          *      1320          *      1340          *
MDV-B-HA : ..... : 1350
pAB124-HA : ..... : 1350
          AGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCAATGGATGAACTCCACAACGAAATA

          1360          *      1380          *      1400
MDV-B-HA : ..... : 1400
pAB124-HA : ..... : 1400
          CTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTC

          *      1420          *      1440          *
MDV-B-HA : ..... : 1450
pAB124-HA : ..... : 1450
          GCAAATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTG

          1460          *      1480          *      1500
MDV-B-HA : ..... : 1500
pAB124-HA : ..... : 1500
          AAGATGAGCATCTCTTGGCACTTGAAAGAAAAGTGAAGAAAATGCTGGGC

          *      1520          *      1540          *
MDV-B-HA : ..... : 1550
pAB124-HA : ..... : 1550
          CCCTCTGCTGTAGACATAGGGAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAATG

          1560          *      1580          *      1600
MDV-B-HA : ..... : 1600
pAB124-HA : ..... : 1600
          CAACCAGACTTGCCCTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAG

          *      1620          *      1640          *
MDV-B-HA : ..... : 1650
pAB124-HA : ..... : 1650
          AATTTTCTCTCCCACTTTTGATTCACATAAATATTACTGCTGCATCTTTA

          1660          *      1680          *      1700

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

          1860      *      1880
MDV-B-HA : ..... : 1884
pAB124-HA : ..... : 1884
          AAAAAAGTTATTGAAAAATGCTCTTGTACTACT
    
```

Fig. 7 Cont.

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

Fig. 7 Cont.

ES 2 402 061 T3

```

MDV-B-NP : ..... : 600
          TACTTCAGCCCTATAAGAATTACCTTTTTAAAAGAAGAGGTGAAAACAAT

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

          660      670      680      690      700
pAB125-NP : ..... : 700
MDV-B-NP : ..... : 700
          TGATTGGGCATTACAGATGAACGATGTCTGTTCCAAAGATCAAAGGCA

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig 7. Cont.



```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig 7. Cont.

ES 2 402 061 T3

```
MDV-B-NP : ..... : 1700
          CAATCCCATTGAGATTCCAATTAAGCAGACCATCCCCAATTTCTTCTTTG

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

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

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

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

Fig. 7 Cont.

NA

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

                560     *      580     *      600

```

Fig. 7 Cont.

```

pAB126-NA : ..... : 600
MDV-B-NA   : ..... : 600
           TGTAGAAAACCTCCATTTTCCACATGGCAGCTTGGAGTGGGTC CGCATGCC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

           1060           *           1080           *           1100
pAB126-NA : ..... : 1100
MDV-B-NA   : ..... : 1100
           TAACAGGGCCTTGCGAATCTAATGGGGACAAAGGGCTTGGAGGCATCAA
    
```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig 7. Cont.

```

M
      *      20      *      40      *
pAB127-M : ..... : 50
MDV-B-M  : ..... : 50
          AGCAGAAGCACGCACTTTCTTAAAATGTCGCTGTTGGAGACACAATTGC

      60      *      80      *      100
pAB127-M : ..... : 100
MDV-B-M  : ..... : 100
          CTACCTGCTTTCACTAACAGAAGATGGAGAGGCAAAGCAGAACTAGCAG

      *      120      *      140      *
pAB127-M : ..... : 150
MDV-B-M  : ..... : 150
          AAAAATTACACTGTTGGTTCGGTGGGAAAGAATTGACCTAGACTCTGCT

      160      *      180      *      200
pAB127-M : ..... : 200
MDV-B-M  : ..... : 200
          TTGGAATGGATAAAAAACAAAAGATGCCTAACTGATATACAAAAGCACT

      *      220      *      240      *
pAB127-M : ..... : 250
MDV-B-M  : ..... : 250
          AATTGGTGCCTCTATCTGCTTTTAAAACCCAAAGACCAAGAAAGAAAA

      260      *      280      *      300
pAB127-M : ..... : 300
MDV-B-M  : ..... : 300
          GAAGATTCATCACAGAGCCCTGTGAGGAATGGGAACAACAGCAACAAA

      *      320      *      340      *
pAB127-M : ..... : 350
MDV-B-M  : ..... : 350
          AAGAAAGCCTGATTCTAGCTGAGAGAAAAATGAGAAGATGTGTGAGTTT

      360      *      380      *      400
pAB127-M : ..... : 400
MDV-B-M  : ..... : 400
          TCATGAAGCATTGAAATAGCAGAAGGCCATGAAAGCTCAGCACTACTAT

      *      420      *      440      *
pAB127-M : ..... : 450
MDV-B-M  : ..... : 450
          ATTGTCTCATGGTCATGTACCTGAACCCTGGAAATTATTCAATGCAAGTA

      460      *      480      *      500
pAB127-M : ..... : 500
MDV-B-M  : ..... : 500
          AAAGTAGGAACGCTCTGTGCTTTATGCGAGAAACAAGCATCACATTCACA

      *      520      *      540      *
pAB127-M : ..... : 550
MDV-B-M  : ..... : 550
          AAGAGCTCATAGCAGAGCAGCAAGATCTTCAGTGCCTGGAGTGAGGCGAG

      560      *      580      *      600
pAB127-M : ..... : 600
  
```

Fig. 7 Cont.

```

MDV-B-M : ..... : 600
          AAATGCAGATGGTTTCAGCTGTGAACACAGCAAAAACAATGAATGGAATG
          *      620      *      640      *
pAB127-M : ..... : 650
MDV-B-M : ..... : 650
          GGGAAGGGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGAAGAGCTGCBAAGCAACAT
          660      *      680      *      700
pAB127-M : ..... : 700
MDV-B-M : ..... : 700
          TGGAGTATTGAGATCTCTGGGGCAAGTCAAAAGARTGGAGAAGGAATTG
          *      720      *      740      *
pAB127-M : ..... : 750
MDV-B-M : ..... : 750
          CAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAAATTCAGCT
          760      *      780      *      800
pAB127-M : ..... : 800
MDV-B-M : ..... : 800
          CTTGTGAAGAAATACCTATAATGCTCGAACCATTCAGATTCTTCAATT
          *      820      *      840      *
pAB127-M : ..... : 850
MDV-B-M : ..... : 850
          TGTCTTTTCATTTATCAGCTCTCCATTCATGGCTTGGACAATAGGGCA
          860      *      880      *      900
pAB127-M : ..... : 900
MDV-B-M : ..... : 900
          TTTGAATCAAATAAAAAGAGGAGTAAACCTGAAAATACGAATAAGAAATC
          *      920      *      940      *
pAB127-M : ..... : 950
MDV-B-M : ..... : 950
          CAAATAAAGAGACAATAAACAGAGAGGTATCAATTTTGAGACACAGTTAC
          960      *      980      *      1000
pAB127-M : ..... : 1000
MDV-B-M : ..... : 1000
          CAAAAAGAAATCCAAGCCAAAGAAACAATGAAGGAAGTACTCTTGACAA
          *      1020      *      1040      *
pAB127-M : ..... : 1050
MDV-B-M : ..... : 1050
          CATGGAGATATTGAGTGACCACATAGTAATTGAGGGGCTTTCTGCTGAAG
          1060      *      1080      *      1100
pAB127-M : ..... : 1100
MDV-B-M : ..... : 1100
          AGATAATAAAAATGGGTGAAACAGTTTGGAGGTAGAAGAATTGCAGTAA
    
```

Fig. 7 Cont.

```

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

                1160      *      1180      *
pAB127-M : ..... : 1190
MDV-B-M  : ..... : 1190
          ATGTCAGCAAATAAACTGGAAAAAGTGGGTTGTTTCTACT

```

Fig. 7 Cont.



ES 2 402 061 T3

```

NS
      10      20      30      40      50
pAB128-NS : ..... : 50
MDV-B-NS  : ..... : 50
          AGCAGAAGCAGAGGATTGTTTGTACTACTGGCAAACGGAAAAAATGGCG

      60      70      80      90     100
pAB128-NS : ..... : 100
MDV-B-NS  : ..... : 100
          GACAACATGACCACAACACAAATTGAGGTAGGTCCGGGAGCAACCAATGC

      110     120     130     140     150
pAB128-NS : ..... : 150
MDV-B-NS  : ..... : 150
          CACCATAAACCTTGAAGCAGGAATTCTGGAGTGCTATGAAAGGCTTTCAT

      160     170     180     190     200
pAB128-NS : ..... : 200
MDV-B-NS  : ..... : 200
          GGCAAAGAGCCCTTGACTACCCTGGTCAAGACCGCCTAAACAGACTAAAG

      210     220     230     240     250
pAB128-NS : ..... : 250
MDV-B-NS  : ..... : 250
          AGAAAATTAGAAATCAAGAATAAAGACTCACAAACAAAAGTGAGCCTGAAAG

      260     270     280     290     300
pAB128-NS : ..... : 300
MDV-B-NS  : ..... : 300
          TAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAGCAATTGGGGTAAAAATGATGA

      310     320     330     340     350
pAB128-NS : ..... : 350
MDV-B-NS  : ..... : 350
          AAGTGCTCCTATTTATGAATCCATCTGCTGGAATTGAAGGGTTTGAGCCA

      360     370     380     390     400
pAB128-NS : ..... : 400
MDV-B-NS  : ..... : 400
          TACTGTATGAAAAATTCTCAAATAGCAACTGTCCAAACTGCAATTGGAC

      410     420     430     440     450
pAB128-NS : .....G..... : 450
MDV-B-NS  : ..... : 450
          CGATTACCCTCCAACACCAGGAAAGTGCCTTGATGACATAGAAGAAGAAC

      460     470     480     490     500
pAB128-NS : ..... : 500
MDV-B-NS  : ..... : 500
          CGGAGAATGTTGATGACCCAAGTAAATAGTATTGAGGGACATGAACRAC

      510     520     530     540     550
pAB128-NS : ..... : 550
MDV-B-NS  : ..... : 550
          AAAGATGCARGGCAAAGATAAAGGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGG

      560     570     580     590     600
pAB128-NS : ..... : 600
  
```

Fig. 7 Cont.

```

MDV-B-NS : ..... : 600
          GAAGTTCGTTTGACAATAAAAAGGGATATACGTAATGTGTTGCCTTGA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 7 Cont.

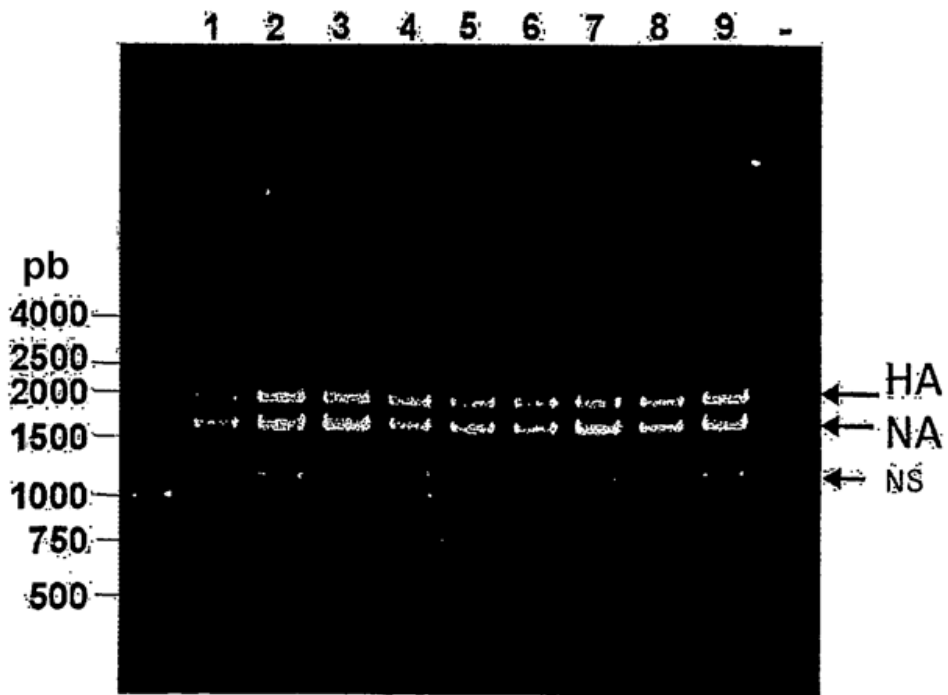


Fig. 8

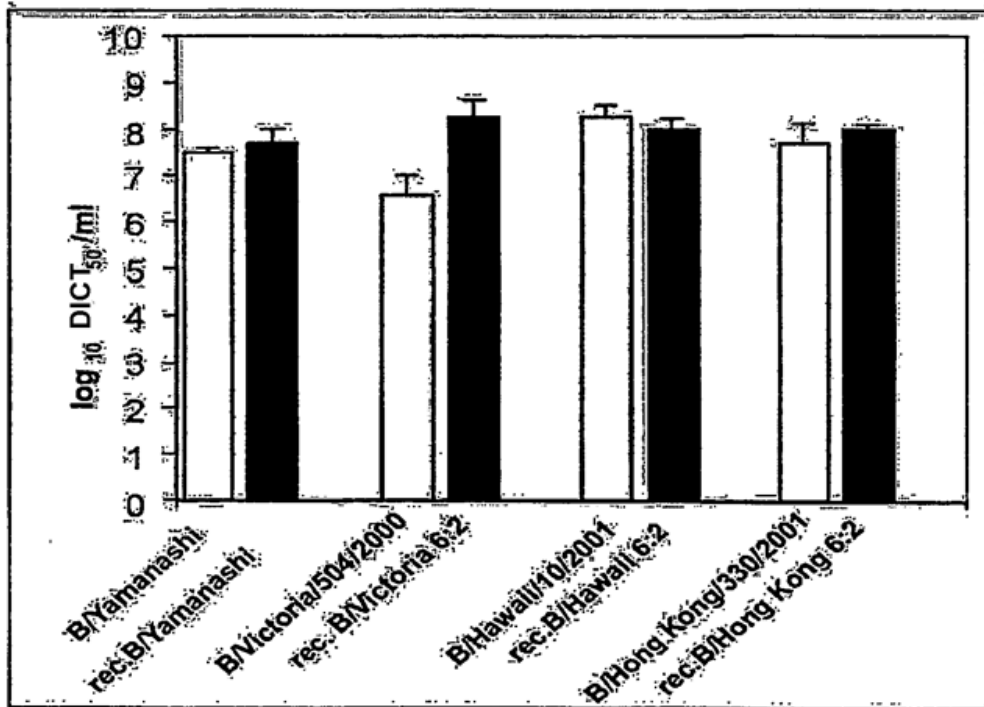


Fig. 9

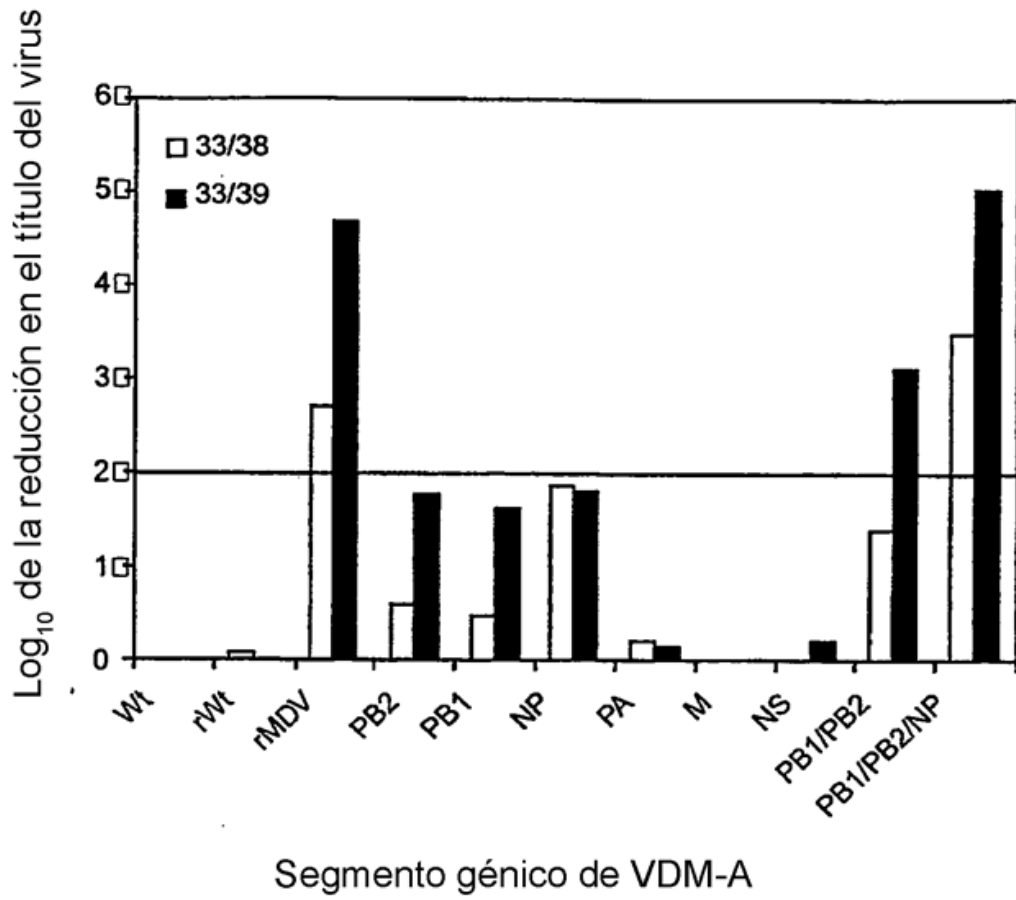


Fig. 10

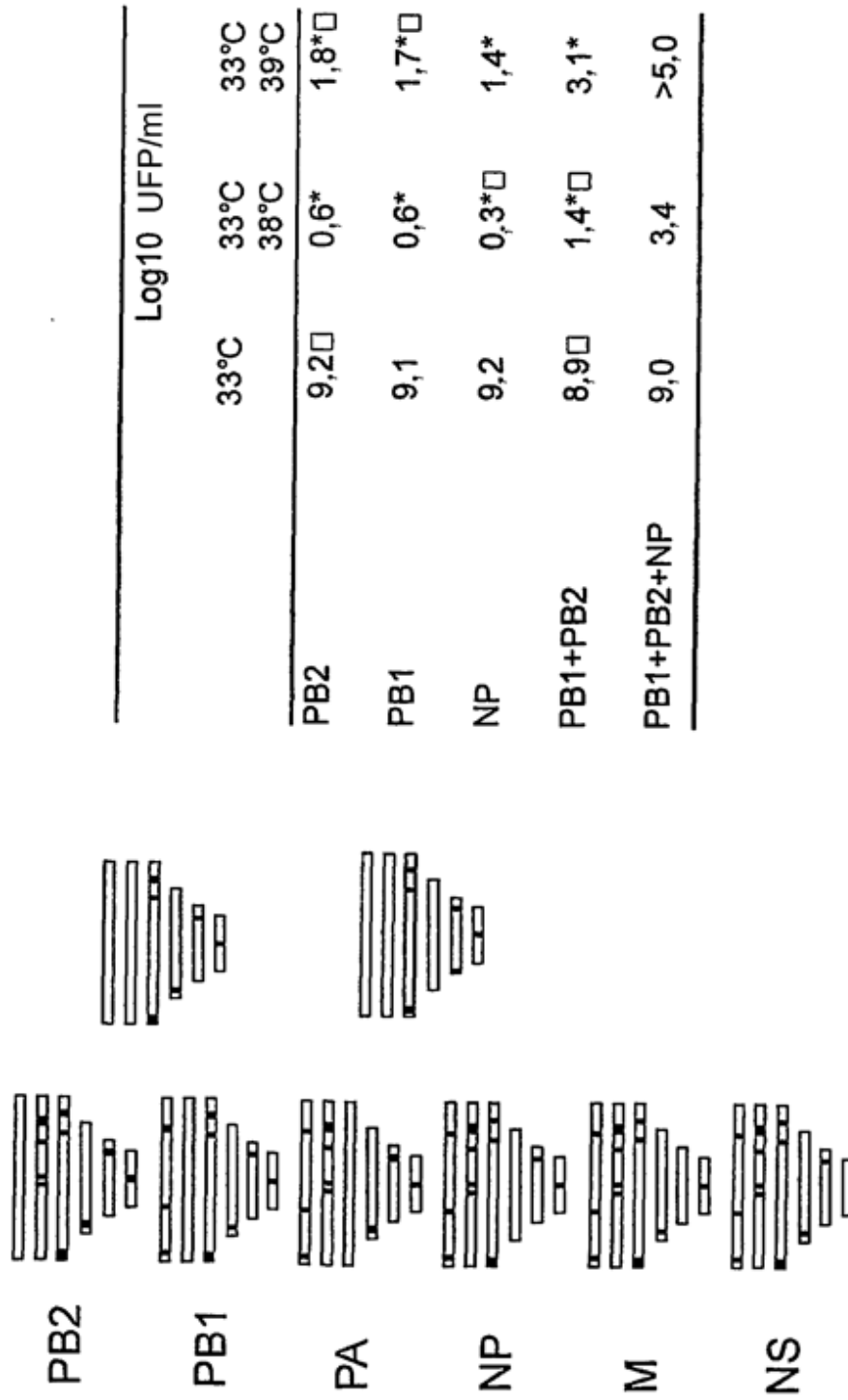


Fig. 11

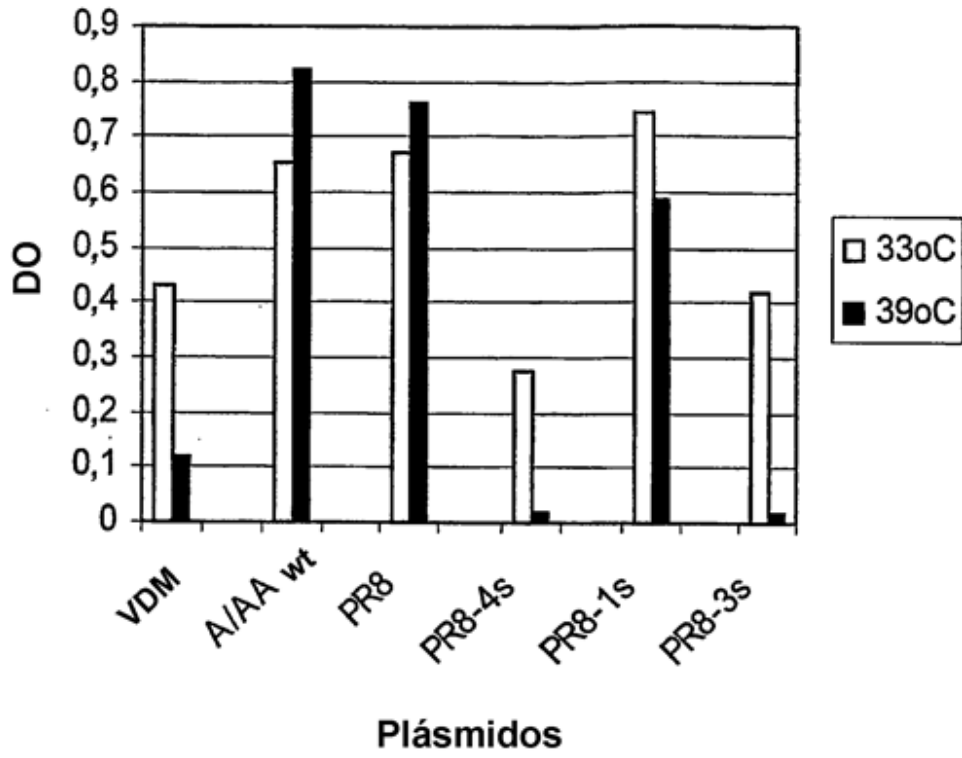


Fig. 12A

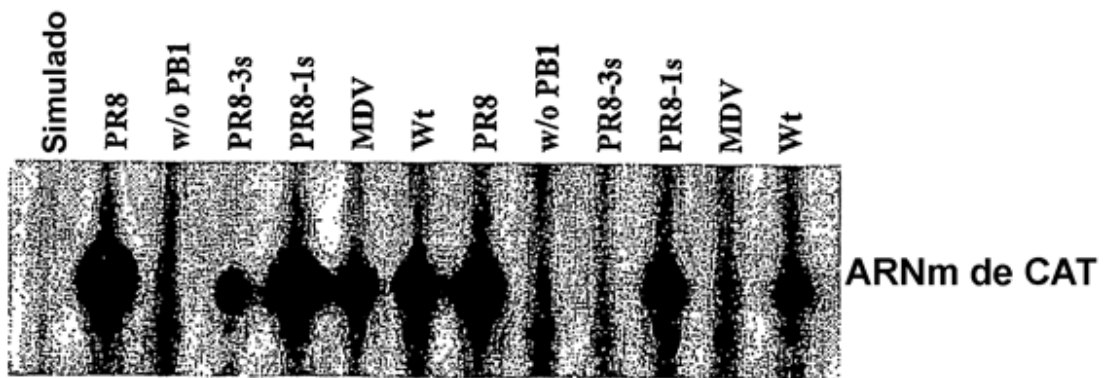


Fig. 12B

PA		NP		M1		MDCK log ufp/ml	PCK log DICT <sub>50</sub> /ml		
431	497	55	114	410	509			159	183
M H	A A H T	Q V	ts	33°C	37°C	Δlog	33°C	37°C	Δlog
V Y	T V P A	H M	no ts	6,6	<2	>3	5,6	3,0	2,6
V Y	A V P A	H M	no ts	7,6	6,6	1,0	8,1	7,4	0,7
V Y	A V P A	H M	no ts	7,6	7,1	0,5	7,4	6,5	0,95
M H	A A H T	Q V	ts	8,1	7,1	1,0	7,7	6,5	1,20
V Y	T V P A	H M	no ts	7,1	3,1	4,0	7,1	3,5	3,6
V Y	A V P A	H M	no ts	8,1	7,1	1,0	8,7	7,8	0,9
V Y	A V P A	H M	no ts	8,1	7,2	0,9	8,5	7,8	0,7

Fig. 13



PA		NP		M1		MDCK log <sub>10</sub> ufp/ml	PCK log <sub>10</sub> DICT <sub>50</sub> /ml		
431 497	55 114	410 509	159 183						
M H	A A HT	H M	ts	7,1	3,2	3,9	6,2	3,3	2,9
M H	A V PA	Q V	ts	n.d.			5,8	2,9	2,9
V Y	A A HT	Q V	ts	6,2	3,2	3,0	6,1	2,7	3,4
V Y	A A HT	H M	ts	7,4	4,4	3,0	7,5	3,4	4,1
V Y	A A HT	H M	ts	7,6	4,2	3,4	8,3	4,3	4,0
M H	A V PA	H M	ts	7,4	4,4	3,0	8,1	4,3	3,8
M H	T V PA	H M	ts	8,0	6,0	2,0	8,4	4,3	4,1
V Y	T V PA	Q V	no ts	5,6	6,0	-0,4	6,4	4,5	1,9
V Y	T V PA	Q V	no ts	6,6	5,8	0,8	6,8	4,8	2,0

Fig. 14

PA		NP		M1		no ts	MDCK log ufp./ml	PCK log DICT <sub>50</sub> /ml
431	497	55	114	410	509			
V Y	A V P T	Q V				no ts	33°C 37°C Δlog 6,2 5,2 1,0	33°C 37°C Δlog 6,8 5,5 1,4
V Y	A A P T	Q V				no ts	6,8 6,4 0,4	7,2 6,1 1,1
V Y	A A P T	Q V				no ts	6,4 6,2 0,2	7,1 5,7 1,4
V Y	T A H T	Q V				ts	6,6 4,4 2,2	6,6 3,4 3,2
V Y	A A P T	H M				no ts	7,4 6,8 0,6	8,3 7,0 1,3
V Y	T A P T	H M				no ts	n.d.	8,0 7,2 0,8

Fig. 15

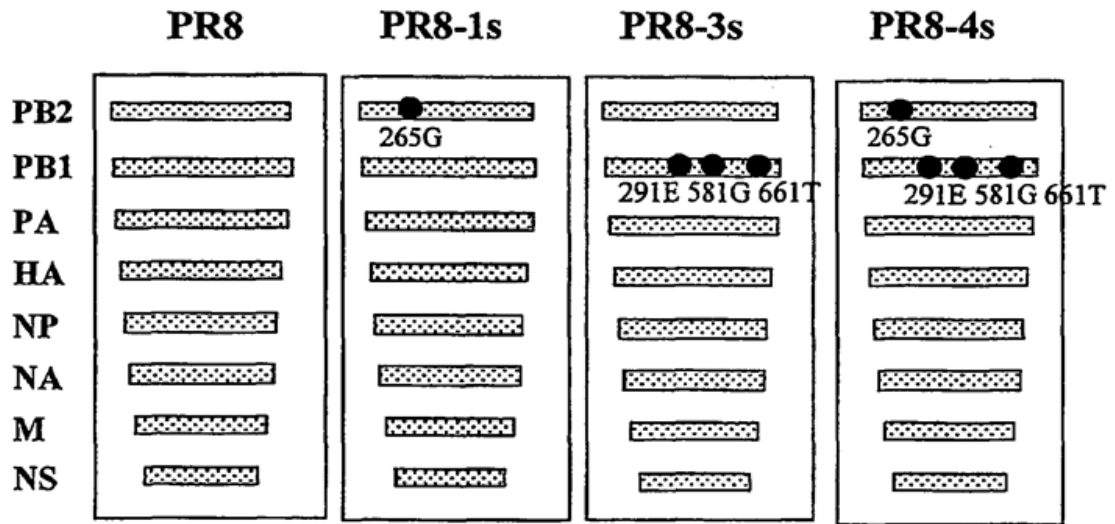


Fig. 16

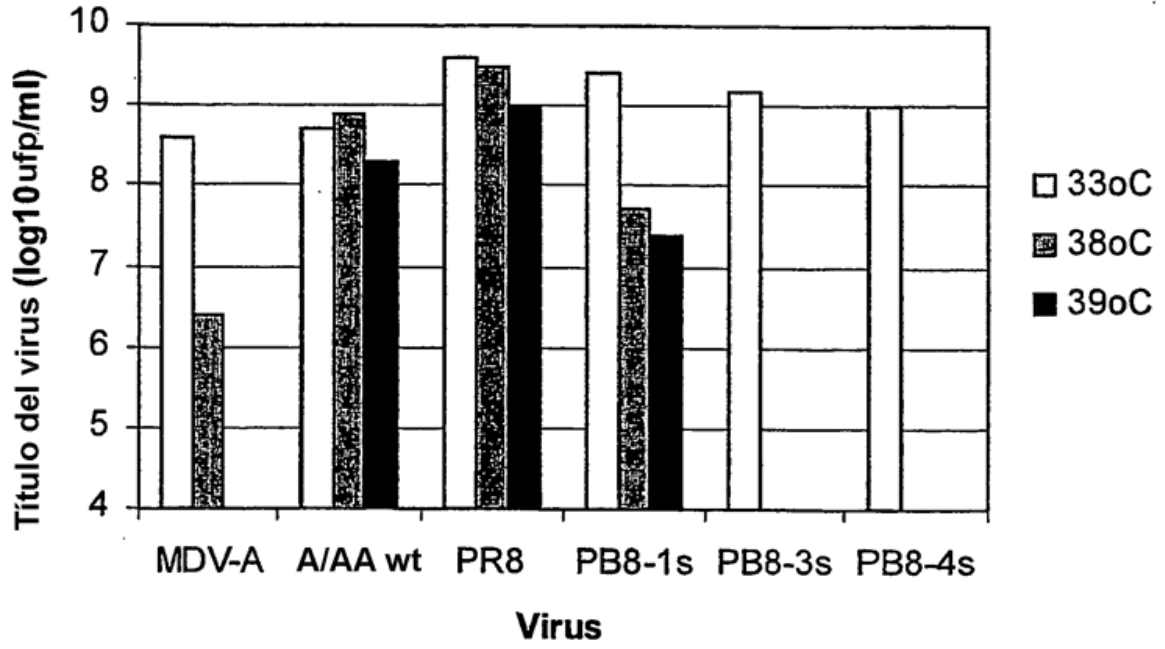


Fig. 17

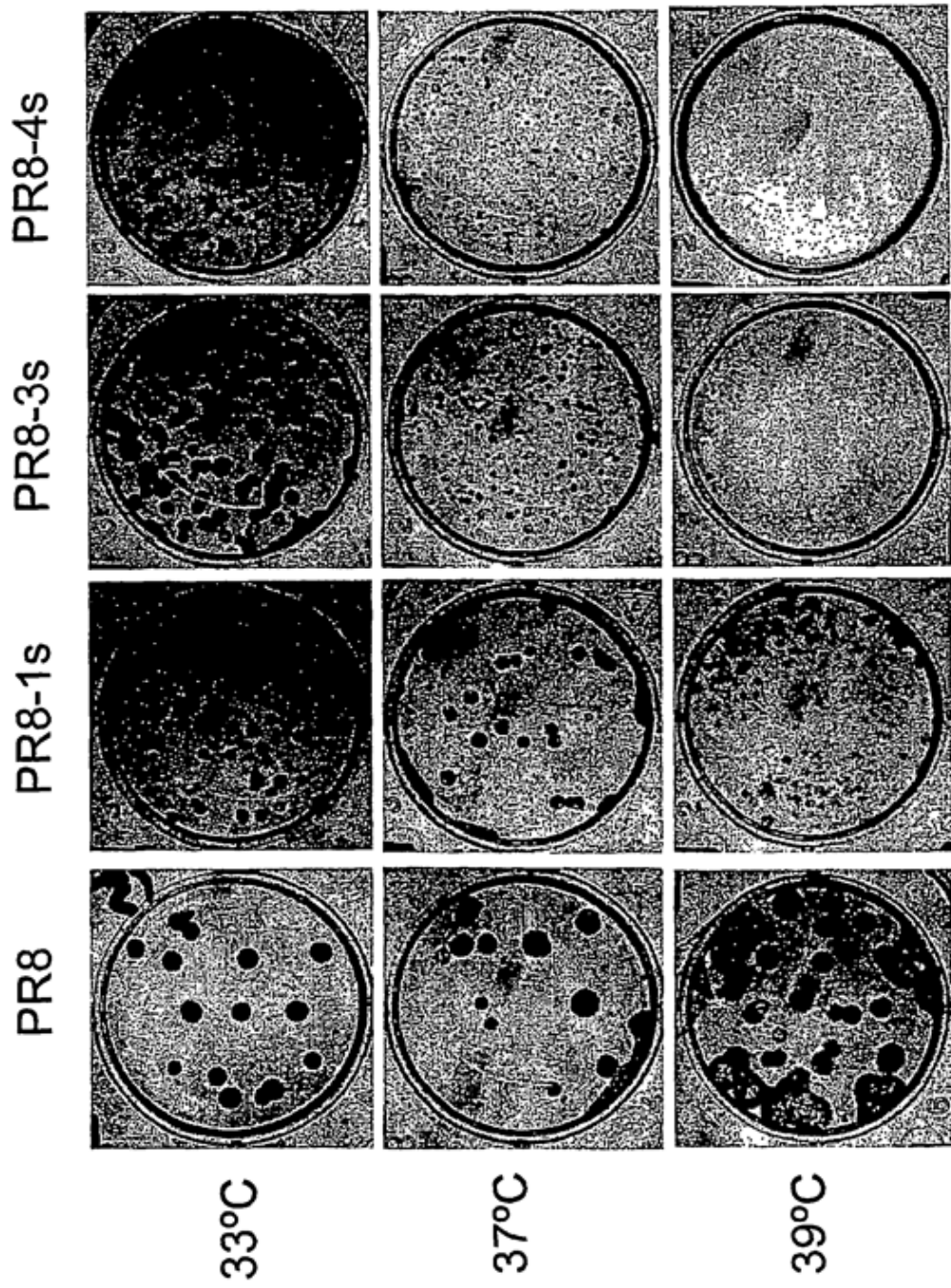


Fig. 18

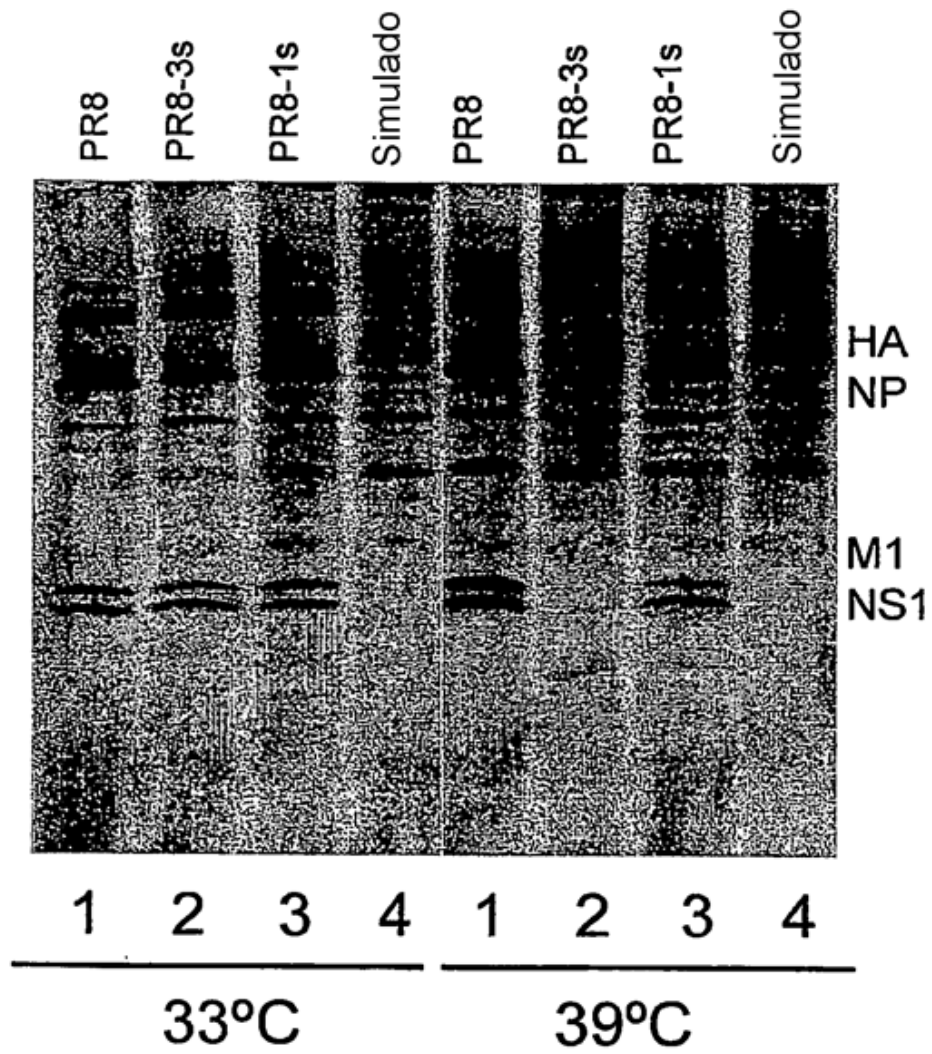


Fig. 19

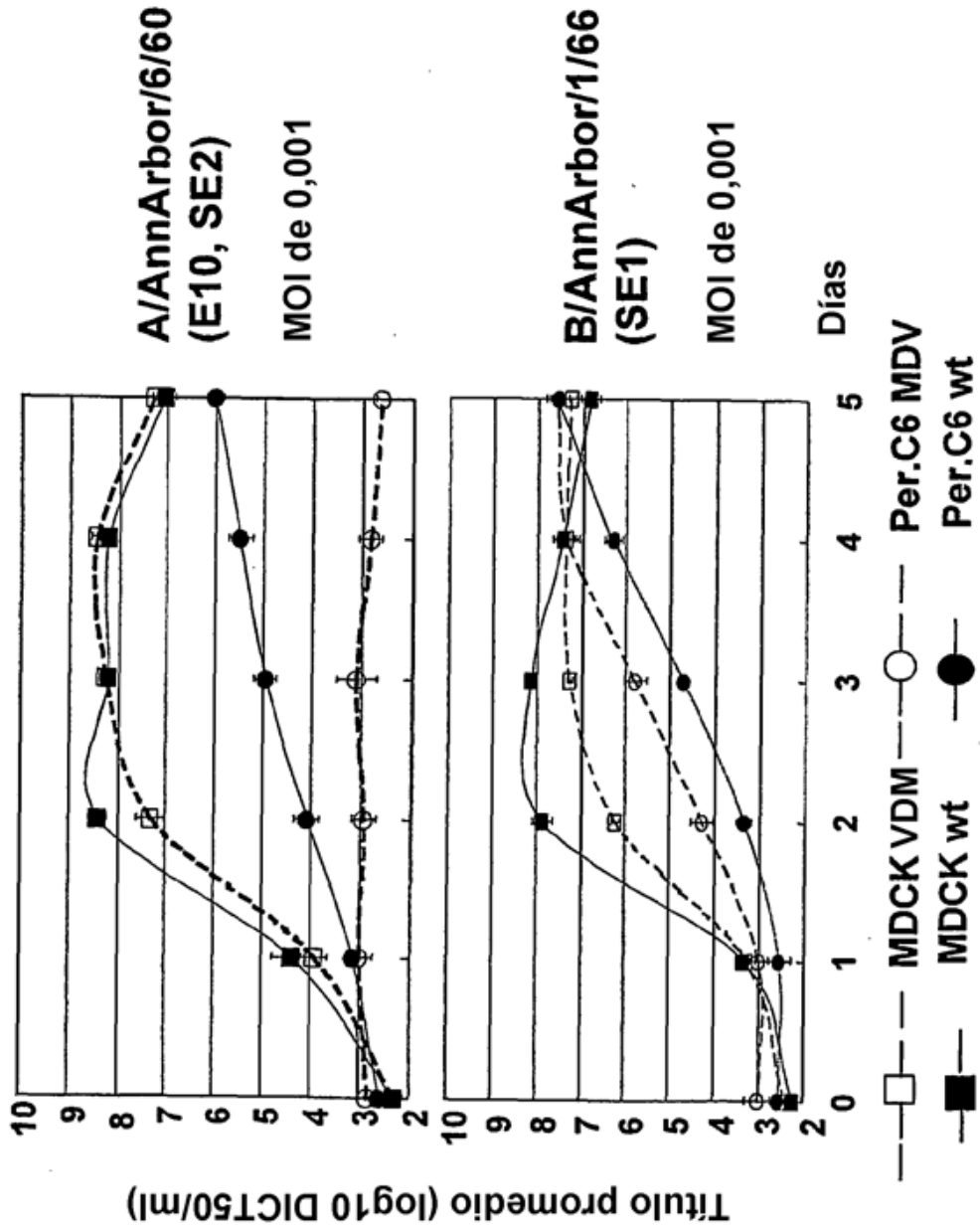


Fig. 20A

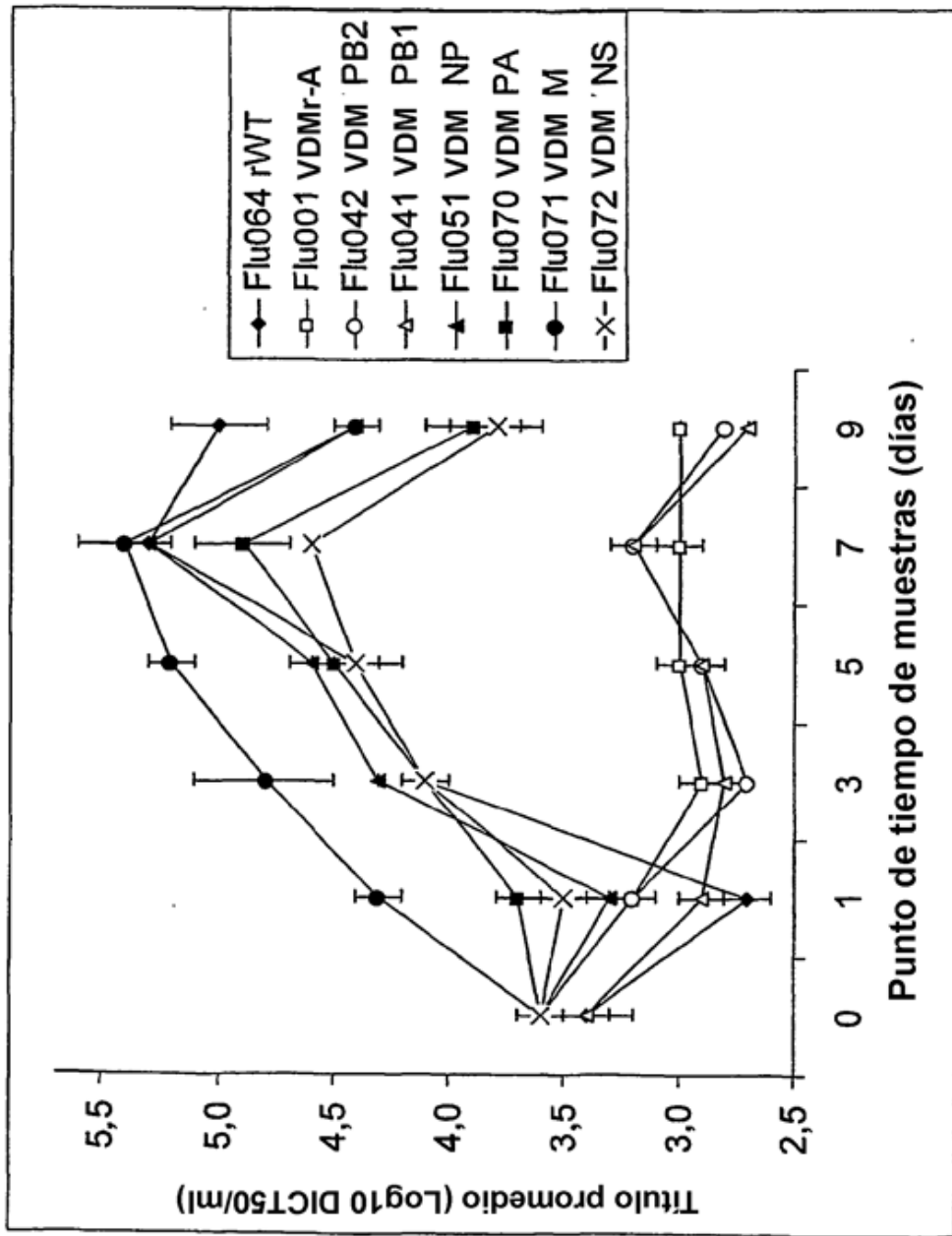


Fig. 20B



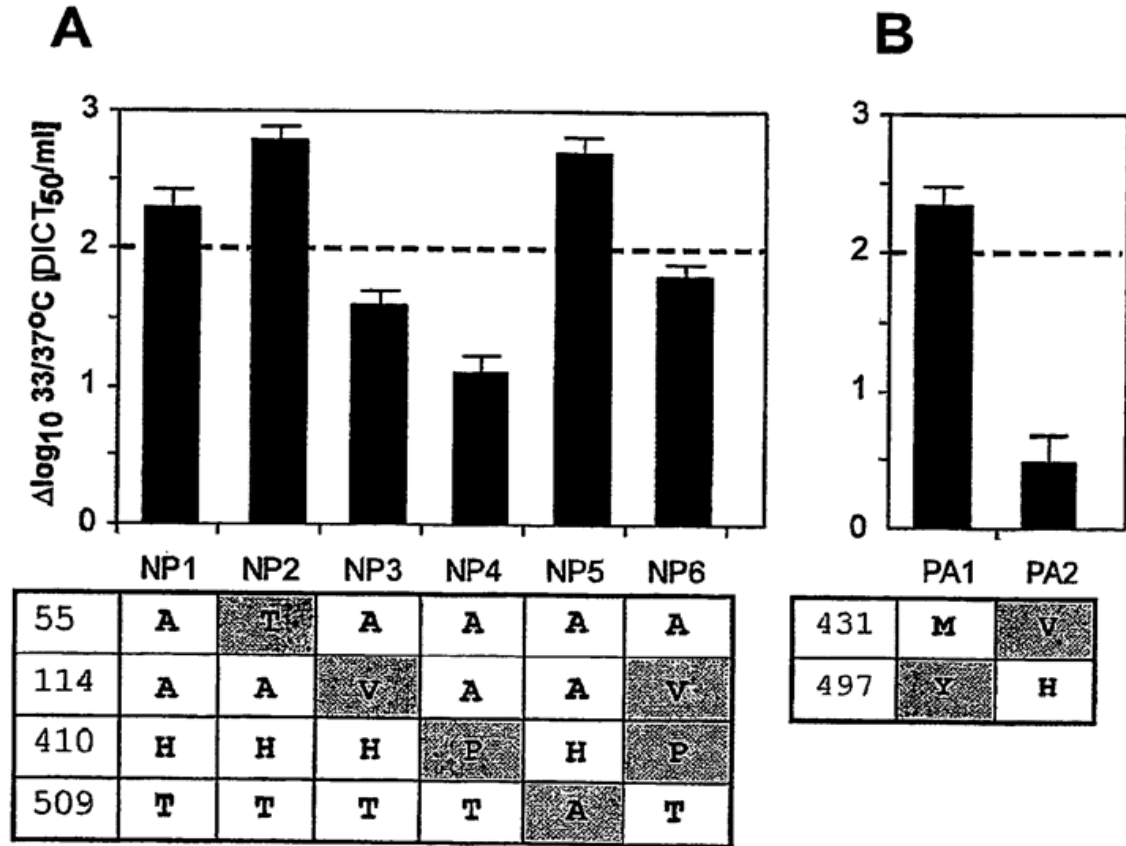
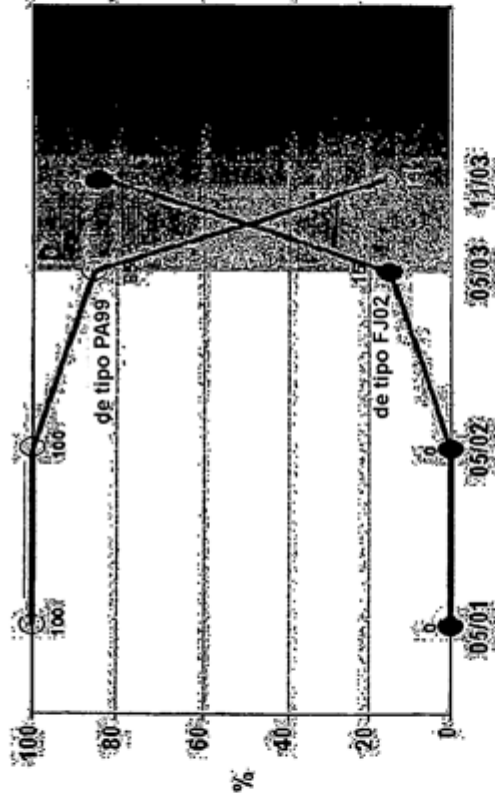


Fig. 21

**Cepas H3N2 con deriva antigénica provocaron un brote de gripe en la temporada 2003-2004**



Fuente de datos: CDC. Flu Activity Reports & Surveillance in the United States

**La temporada de gripe comenzó extraordinariamente pronto, a partir de octubre de 2003  
Mortalidad: 10,3% por neumonía y gripe en EE.UU.**

**144 muertes asociadas con la gripe en sujetos de 18 años y más jóvenes**

**Influenza A predominante (99,4%), en su mayoría cepas H3N2  
La vacuna de la gripe no era eficaz (MMWR 16 de enero de 2004)**

**Fig. 22**

Seroconversión a cepas H3N2 tras una dosis de LAIV o TIV en niños seronegativos (6-35 m)

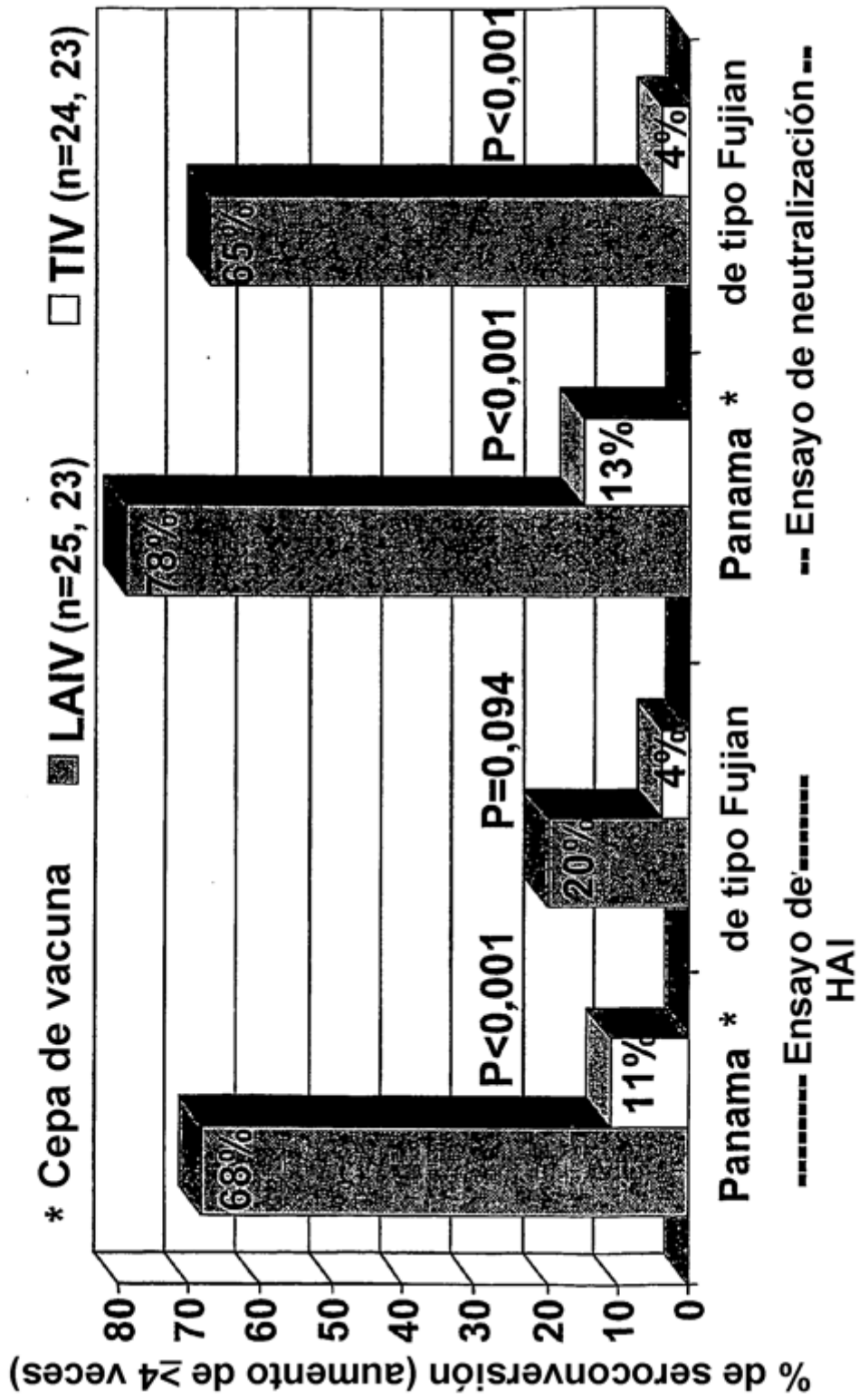
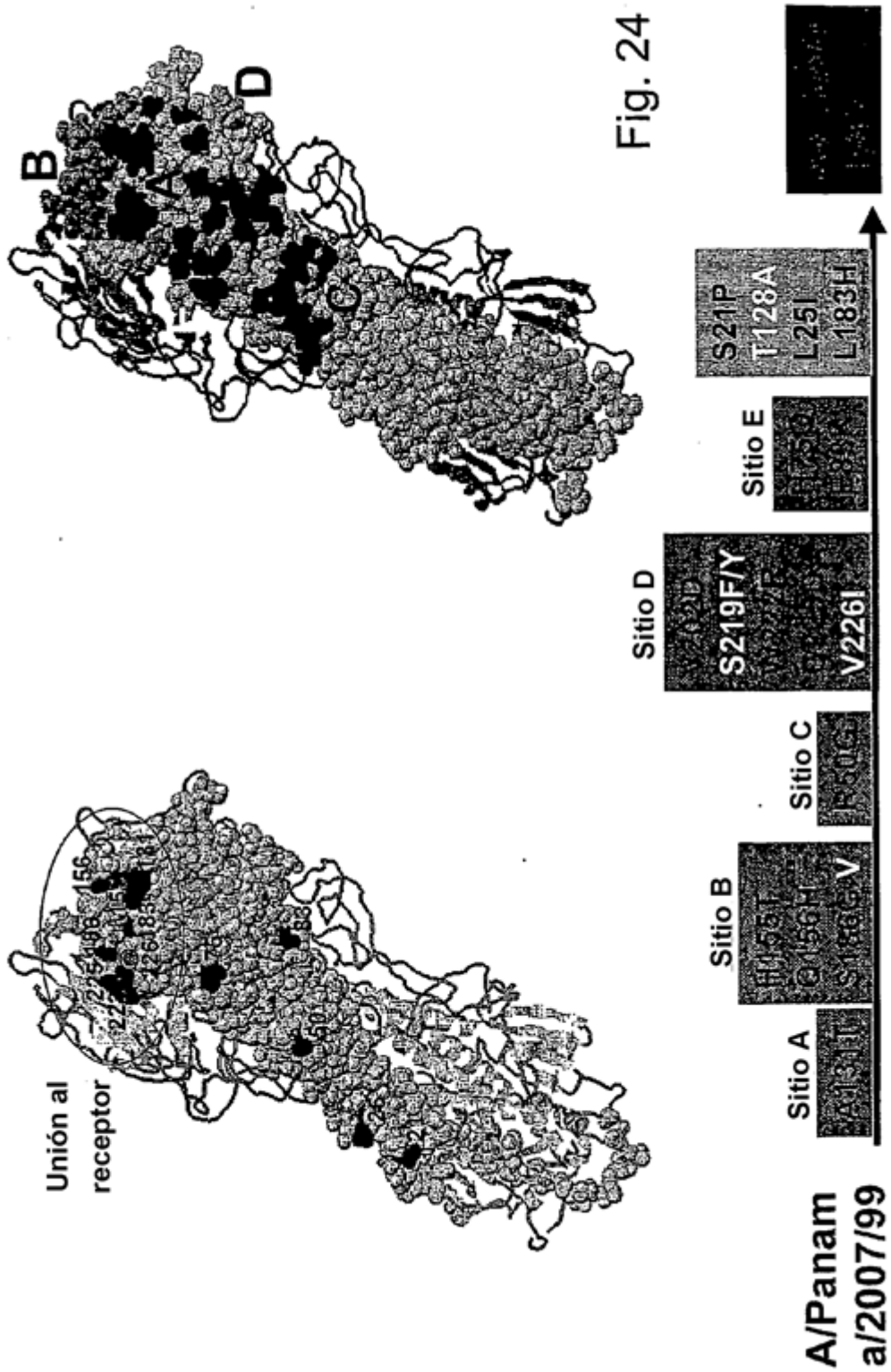


Fig. 23

**Diferencia de aminoácidos entre HA de  
A/Panama/99 y A/Fujian/02**



# Generación de vacunas de influenza atenuadas vivas adaptadas al frío mediante plásmidos

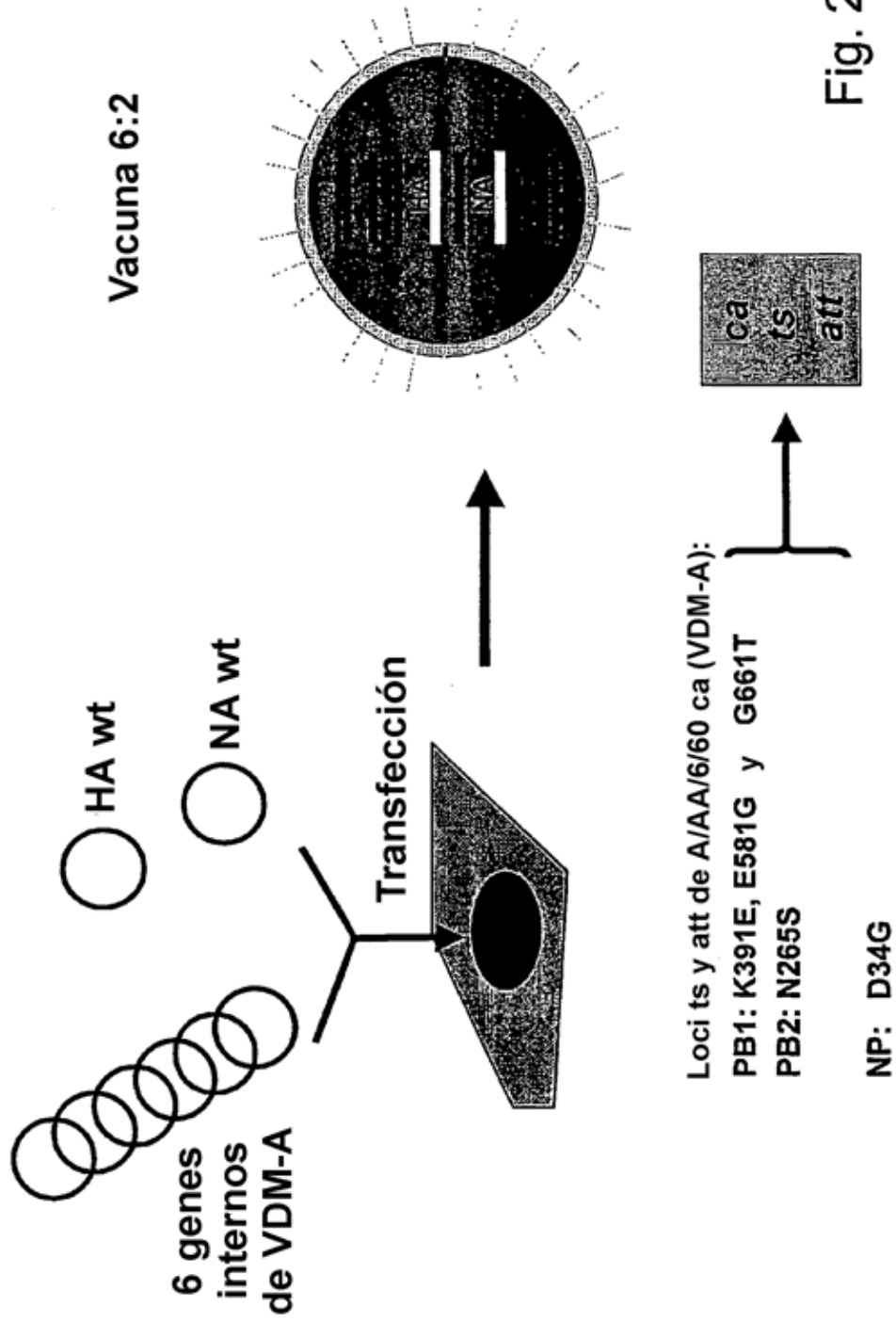


Fig. 25

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

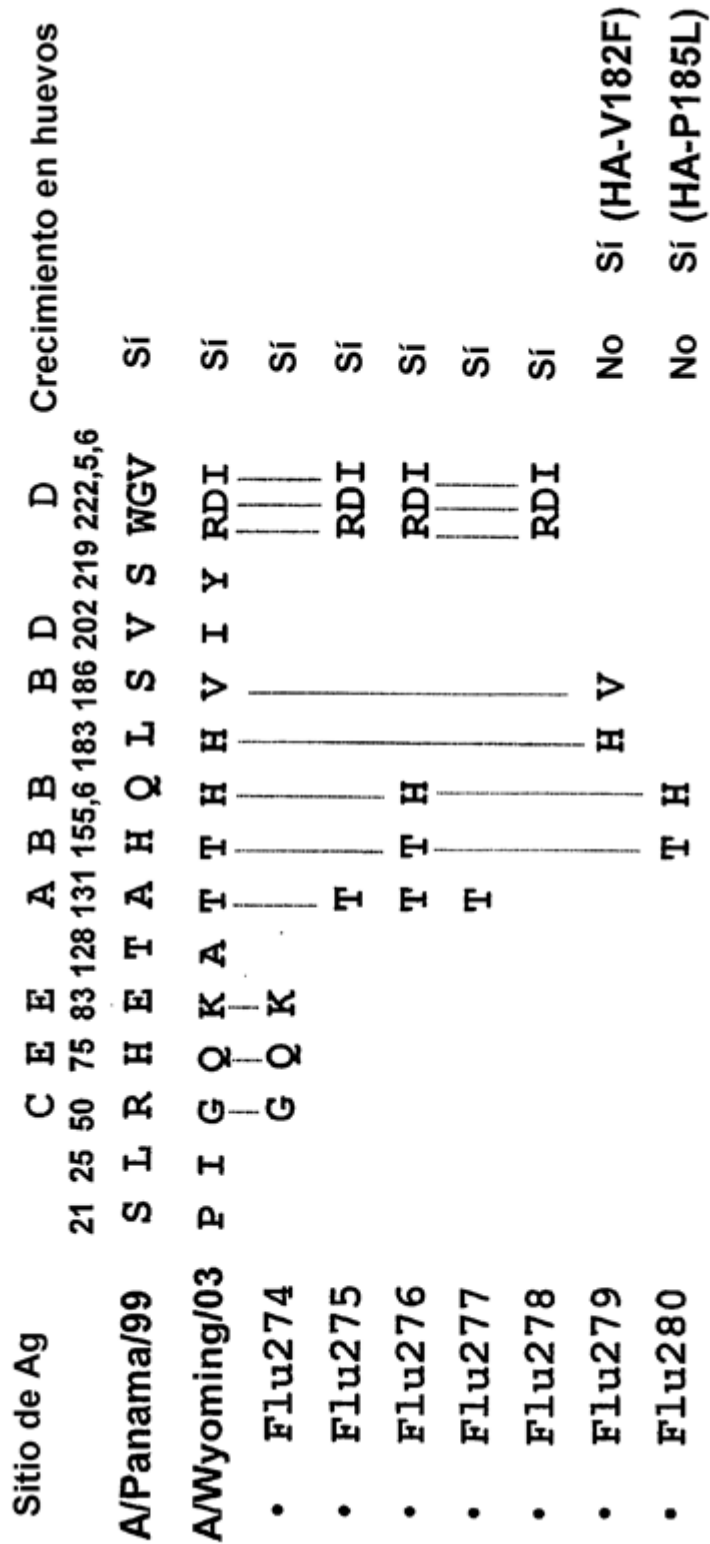


Fig. 26



**Cambio genético mínimo para la deriva antigénica  
de cepas H3N2 antigénicas**

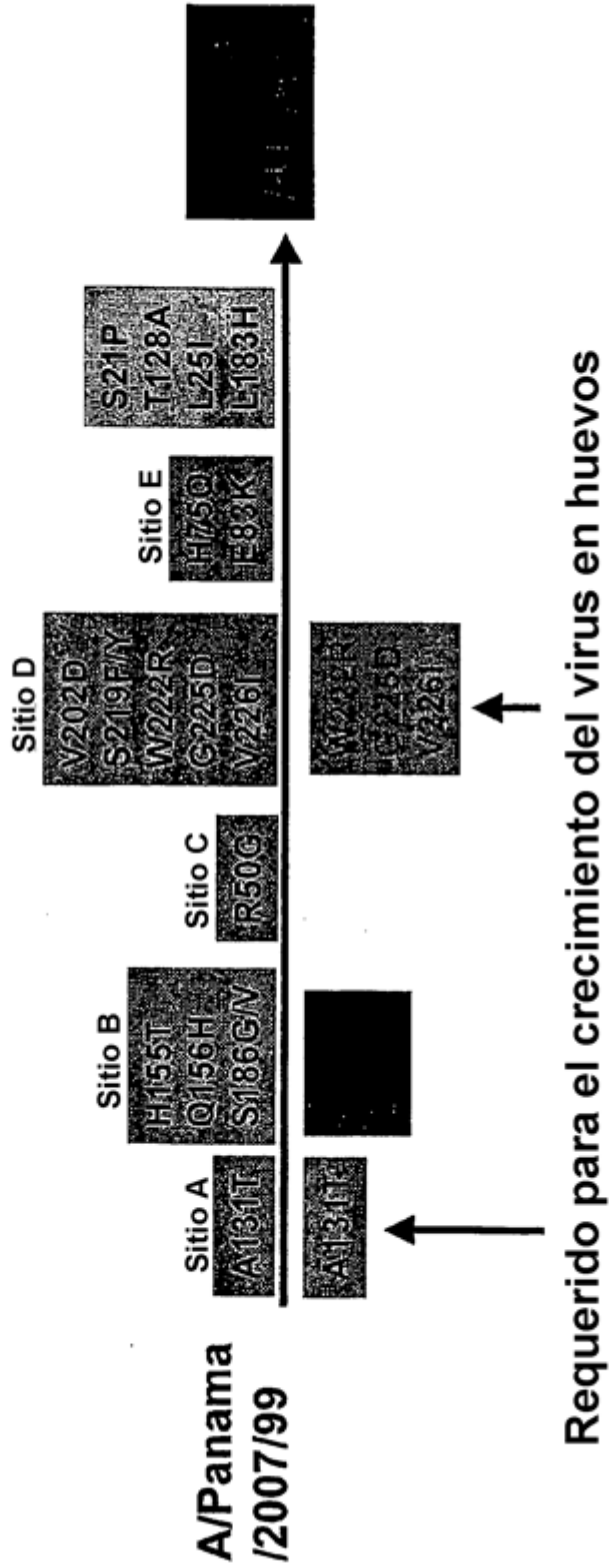



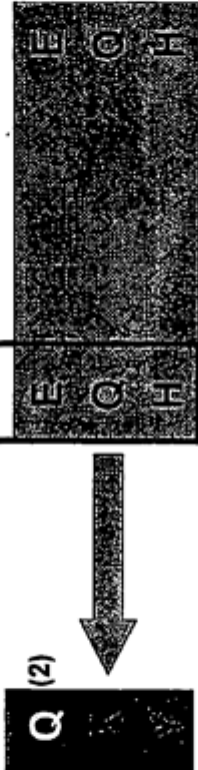
Fig. 28



**Características de cepas de tipo A/Fujian/411/2002**

Cepa de virus	A/Sendai H/F4962/02	A/Fujian /411/02	A/Wyoming <sup>(1)</sup> /03/03
<b>Aislada</b>	<b>12/4/02</b>	<b>8/11/02</b>	<b>2/13/04</b>
<b>Pases</b>	<b>CXE8/E2</b>	<b>C1/C1</b>	<b>spfPCK2E2/E8</b>
<b>Crecimiento en huevos</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>
<b>Nariz de hurón</b>	<b>Escaso</b>	<b>ND</b>	<b>Bueno</b>

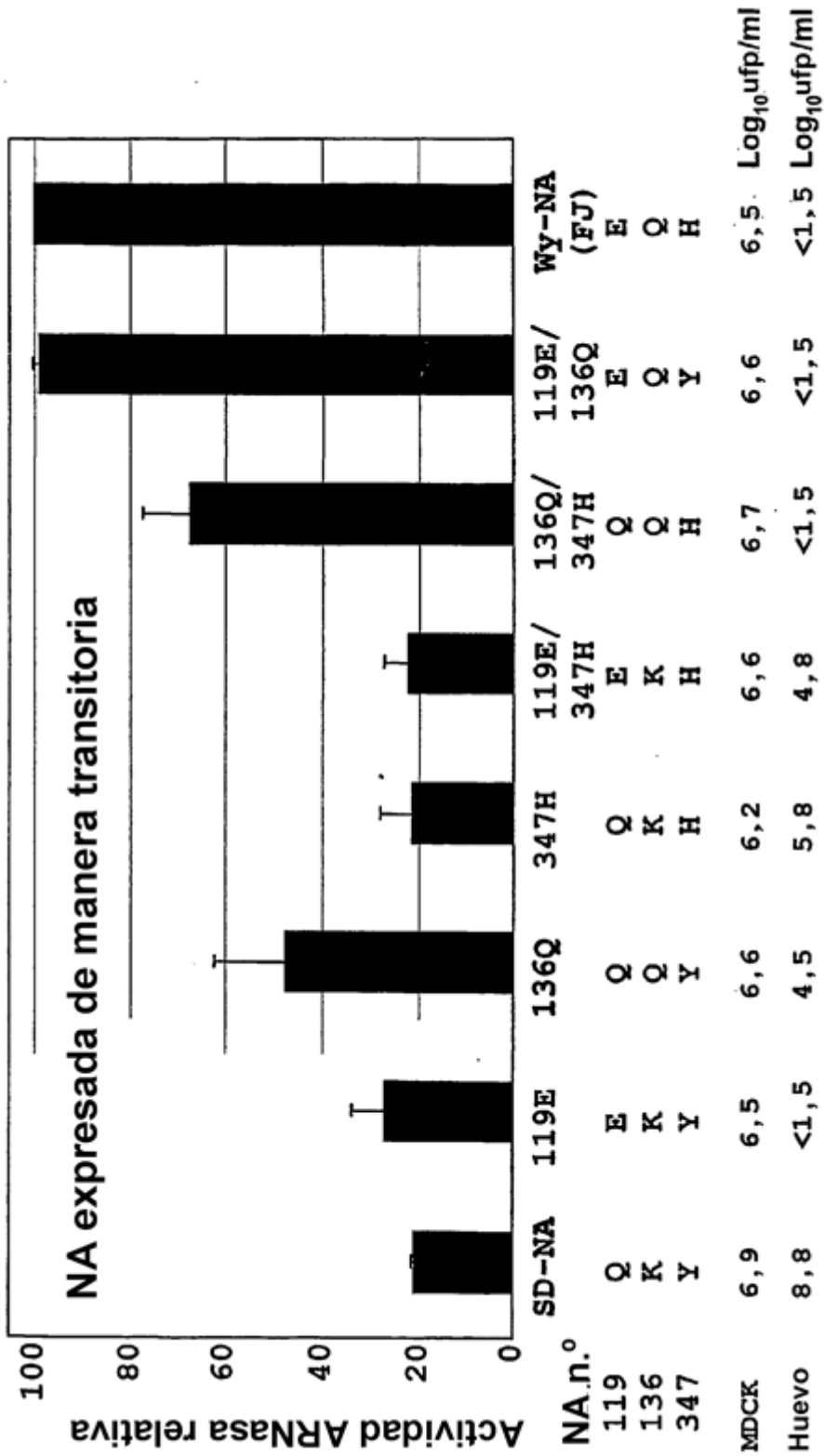
<b>HA</b>	128	
<b>NA</b>	119	
	186	
	219	
	226	
	136	
	347	

<sup>(1)</sup> Cepa de vacuna durante 2004-2005

<sup>(2)</sup> Sitio resistente a inhibidores de neuraminidasa

**Fig. 29**

Fig. 30 Actividades neuraminidasa de NA y replicación de virus



Virus que contiene HA de A/Sendai/02, la Na indicada y los seis segmentos internos de A/AA/6/60 ca

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



Fig. 31

Efecto de residuos de HA sobre la replicación de virus en huevos

NA		Wy-NA	119E/136Q
A		/347H	
186	219	226	
G	S	V	<1,5
V	S	V	4,39
G	S	I	5,20
V	S	I	7,38
V	Y	I	7,40
V	Y	I	7,75
			7,18

Los residuos: HA-186V, 226I y HA-119E, 136Q son suficientes para restaurar la replicación de virus en huevos  
**Fig. 32**

Adaptación de rA/Fujian/02 en huevos

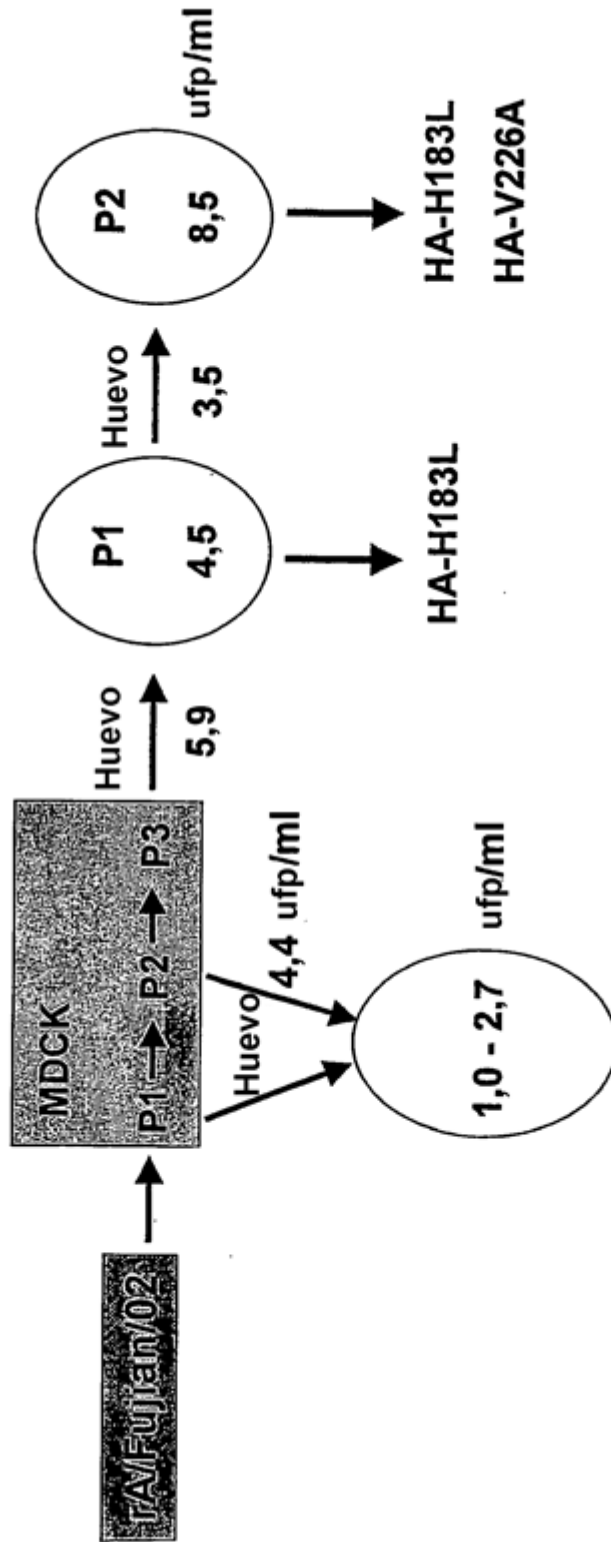


Fig. 33

### Sitios de unión al receptor de HA

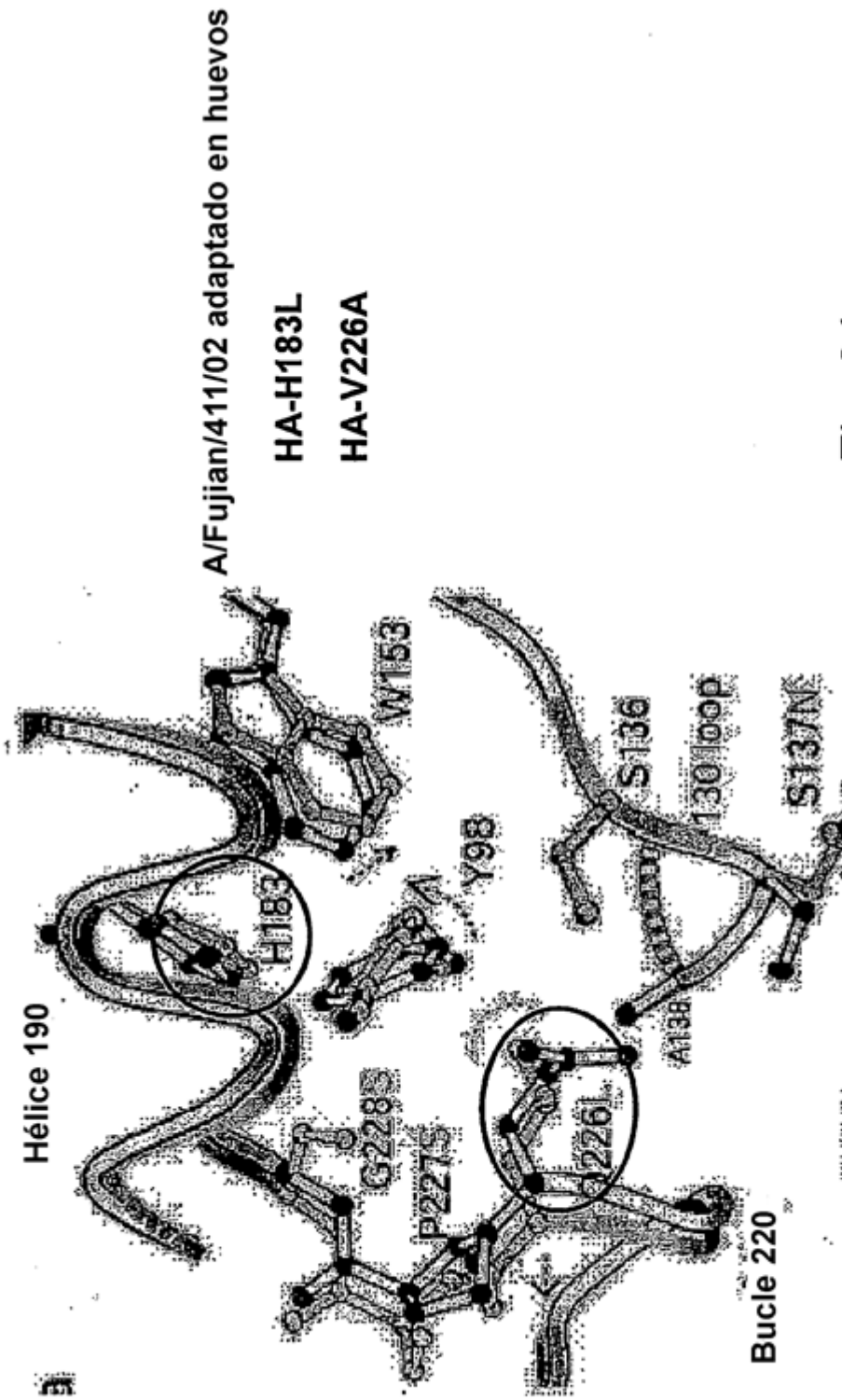


Fig. 34

Ha et al. Virology 309: 209-218, 2003

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

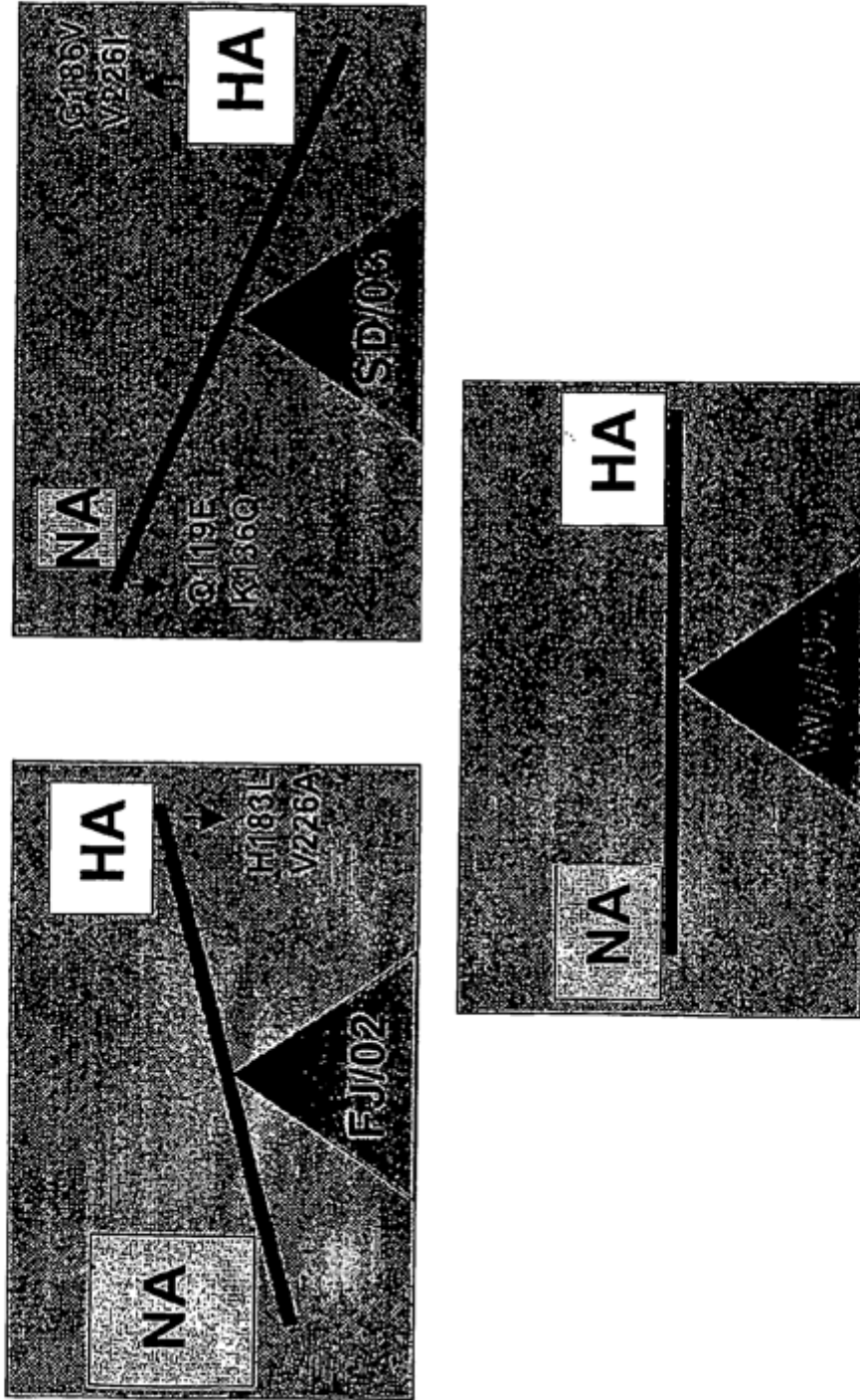


Fig. 35

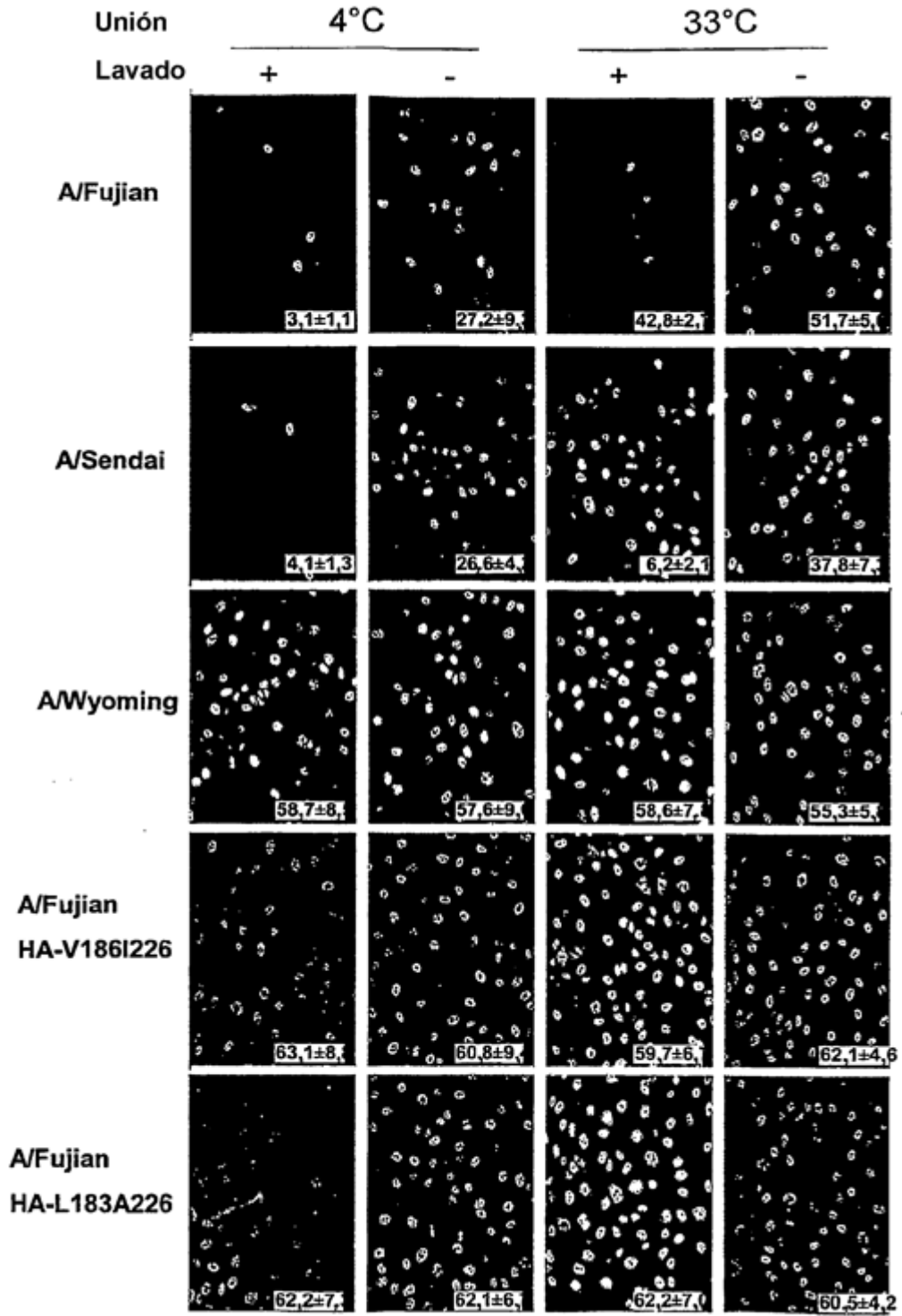
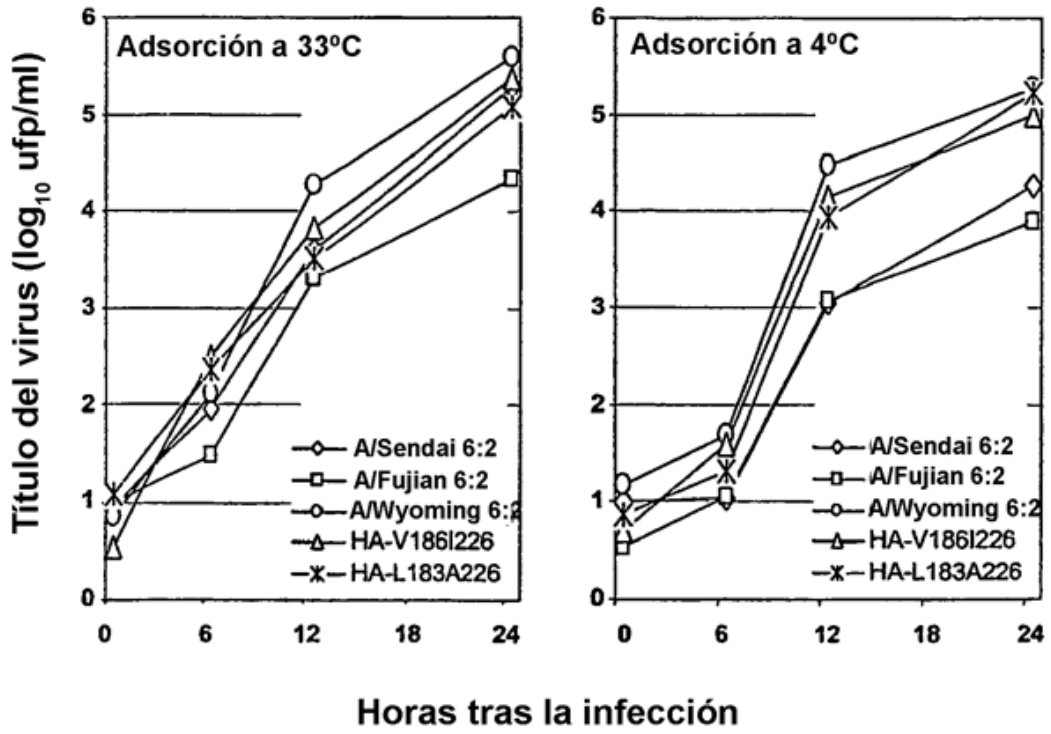
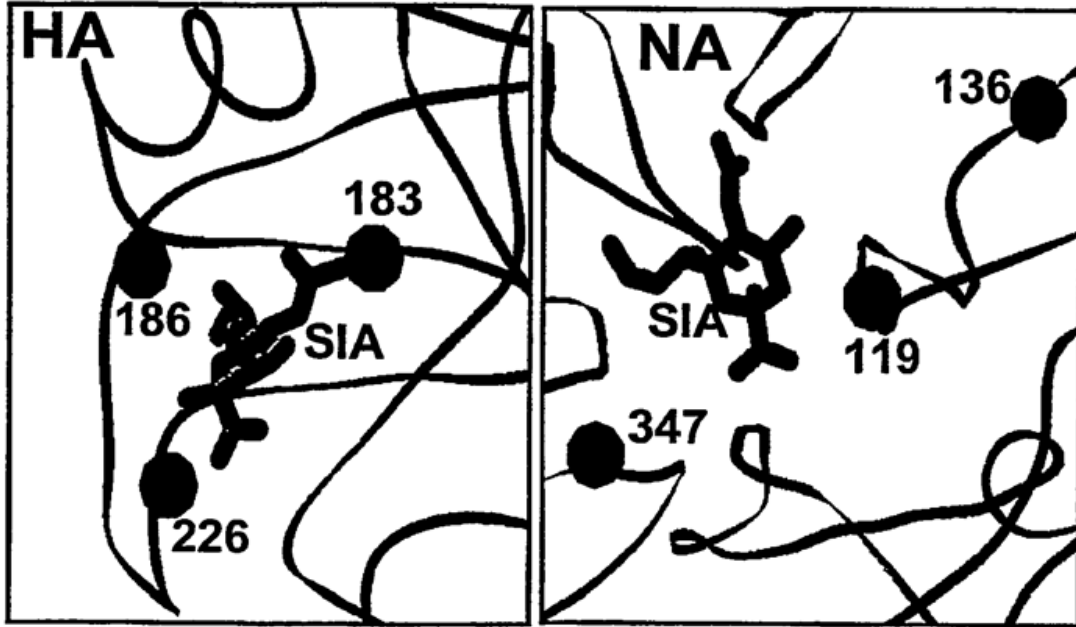


Fig. 36





**Fig. 37**



**Fig. 38**