(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 526 191**

(51) Int. CI.:

C12N 15/87 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2003 E 03724208 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1499348**

(54) Título: **Método para producir virus influenza B infeccioso en cultivo celular**

(30) Prioridad:

26.04.2002 US 375675 P
09.07.2002 US 394983 P
12.09.2002 US 410576 P
18.10.2002 US 419802 P
23.10.2002 US 420708 P
24.03.2003 US 457699 P
10.04.2003 US 462361 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2015

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

HOFFMAN, ERICH;
JIN, HONG;
LU, BIN;
DUKE, GREG y
KEMBLE, GEORGE WILLIAM

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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 para producir virus influenza B infeccioso en cultivo celular

Antecedentes de la invención

Los virus influenza están constituidos por un núcleo interno de ribonucleoproteína que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envuelta de lipoproteína externa cubierta 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 tres polipéptidos, que constituyen la ARN polimerasa dependiente de ARN viral. El segmento 1 codifica para la proteína PB2 del complejo de polimerasa. Las restantes proteínas PB 1 y PA de la polimerasa se codifican por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de influenza A codifica para una proteína pequeña, PB1-F2, producida a partir de un marco de lectura alternativo dentro de la región que codifica para PB1. El segmento 4 codifica para la glicoproteína de superficie hemaglutinina (HA) implicada en la unión a la célula y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica para el polipéptido de nucleoproteína de la nucleocápsida (NP), el componente estructural principal asociado con ARN viral. El segmento 6 codifica para una glicoproteína de la envuelta, neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica para dos proteínas de la matriz, denominadas M1 y M2, que se traducen a partir de ARNm cortados y empalmados de manera diferente. El segmento 8 codifica para NS1 y NS2 (NEP), dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes de ARNm cortado y empalmado de manera alternativa.

Los ocho segmentos del genoma de influenza B codifican para 11 proteínas. Los tres genes más grandes codifican para componentes de la ARN polimerasa, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica para la proteína HA. El segmento 5 codifica para NP. El segmento 6 codifica para la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, NB y NA, se traducen a partir de marcos de lectura solapantes de un ARNm bicistrónico. El segmento 7 de influenza B también codifica para dos proteínas: M1 y M2. El segmento más pequeño codifica para dos productos, NS1 que se traduce a partir del ARN de longitud completa, mientras que NS2 se traduce a partir de una variante de ARNm cortado y empalmado.

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 antígeno de superficie y vacunas de virus atenuados vivos. Aunque las formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacuna pueden producir una respuesta inmunitaria sistémica, las vacunas de virus atenuados vivos también pueden estimular inmunidad de la mucosa local en el tracto respiratorio.

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 338:1403-12; 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 los segmentos génicos de HA y NA derivados de las cepas de tipo natural circulantes actualmente junto con seis segmentos génicos, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, de un virus donador maestro (MDV) común. Se creó el MDV para cepas de influenza A de FluMist (MDV-A) mediante pases en serie de la cepa de tipo natural A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) en cultivo tisular de riñón de pollo primario a temperaturas sucesivamente inferiores (Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213:612-4). MDV-A se replica de manera eficaz a 25ºC (ca, adaptado al frío), pero su crecimiento se restringe a 38 y 39ºC (ts, sensible a la temperatura). Adicionalmente, este virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (att, atenuación). Se cree que el fenotipo ts contribuye a la atenuación de la vacuna en seres humanos restringiendo su replicación en todas las regiones, excepto en las más frías, del tracto respiratorio. La estabilidad de esta propiedad se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos. A diferencia del fenotipo ts de cepas de influenza creadas mediante mutagénesis clínica, la propiedad de ts de MDV-A no se revertió tras el pase a través de hámsteres infectados o en aislados obtenidos de niños (para una revisión reciente, véase Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A y B virus vaccines Viral Immunol 15:295-323).

Estudios clínicos realizados en más de 20.000 adultos y niños que implicaron 12 cepas separadas reordenantes 6:2 han demostrado que estas vacunas son atenuadas, 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 MDV-A y los dos segmentos génicos de HA y NA del virus de tipo natural (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 contra la gripe disponibles comercialmente en los Estados Unidos se han propagado en huevos embrionados de gallina. Aunque el virus influenza crece bien en huevos de gallina, la producción de la vacuna depende de la disponibilidad de huevos. Deben organizarse suministros de huevos y las cepas para la producción de la vacuna deben seleccionarse meses antes de la siguiente temporada de gripe, limitando la flexibilidad de este enfoque, y a menudo dando como resultado retrasos y carencias en la producción y distribución.

También se han desarrollado en los últimos años sistemas para producir virus influenza en cultivo celular (véanse, 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 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 los métodos de cultivo tisular para la producción de vacunas contra la gripe. Recientemente, se han notificado sistemas para producir virus influenza A a partir de plásmidos recombinantes que incorporan ADNc que codifican para el genoma viral (véanse, 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 recombinants 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 la posibilidad de producir virus recombinantes, y virus reordenantes que expresan las proteínas HA y NA inmunogénicas de cualquier cepa seleccionada. Sin embargo, a diferencia del virus influenza A, no se han publicado informes que describan sistemas sólo de plásmidos para el virus influenza B.

Adicionalmente, ninguno de los sistemas sólo de plásmidos disponibles actualmente es adecuado para generar cepas atenuadas, sensibles a la temperatura, adaptadas al frío para la producción de vacunas atenuadas vivas.

Sumario de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones. En el presente documento se da a conocer un sistema de múltiples vectores para la producción de virus influenza en cultivo celular, y 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 contra la gripe atenuadas vivas, tales como las adecuadas para su administración en una formulación de vacuna intranasal.

En un primer aspecto, la descripción proporciona vectores y métodos para producir virus influenza B recombinante en cultivo celular, por ejemplo, en ausencia de virus auxiliar (es decir, sistemas de cultivo celular libres de virus auxiliar). Los métodos dados a conocer en el presente documento implican introducir una pluralidad de vectores, que incorpora cada uno de ellos una parte de un virus influenza B en una población de células huésped que pueden soportar la replicación viral. Las células huésped se cultivan en condiciones permisivas para el crecimiento viral, y se recuperan los virus influenza. En algunas realizaciones, los virus influenza B son 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 vector son virus atenuados, adaptados al frío, sensible a la temperatura, de manera que son adecuados para su administración como una vacuna atenuada viva, por ejemplo, en una formulación de vacuna intranasal. En una realización a modo de ejemplo, los virus se producen introduciendo una pluralidad de vectores que incorporan todo o parte de un genoma de virus influenza B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, un genoma de virus B/Ann Arbor/1/66 ca.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los virus influenza B son virus influenza modificados artificialmente por ingeniería genética 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 dan como resultado sustituciones de aminoácido en una o más de las posiciones $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34}, tales como: $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G). Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que individualmente o en combinación da como resultado aumento de la sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío o atenuación en relación con los virus de tipo natural es una mutación adecuada en el contexto de la presente descripción.

En algunas realizaciones, se introducen 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 inmunogénicos de la superficie de influenza de una cepa de influenza diferente en una población de

células huésped. Por ejemplo, se introducen al menos los 6 segmentos genómicos internos de una cepa de influenza B seleccionada atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, una cepa de B/Ann Arbor/1/66 ca, att, ts o una cepa de influenza B modificada artificialmente por ingeniería genética que incluye una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones especificadas anteriormente, 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 inmunogénicos de superficie incluyen cualquiera o ambos de los antígenos de hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). En realizaciones en las que se introduce un único segmento que codifica para un antígeno inmunogénico de superficie, también se introducen los 7 segmentos complementarios de los virus seleccionados en las células huésped.

En determinadas realizaciones, se introducen una pluralidad de vectores de plásmido que incorporan segmentos genómicos de virus influenza B en una población de células huésped. Por ejemplo, se utilizan 8 plásmidos, que incorporan cada uno de ellos 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 dados a conocer en el presente documento son vectores de expresión bidireccionales. Un vector de expresión bidireccional incluye normalmente un primer promotor y un segundo promotor, en el que los promotores primero y segundo están unidos operativamente a hebras alternativas del mismo ADNc bicatenario que codifica para el ácido nucleico viral que incluye un segmento del genoma de virus influenza. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o una secuencia de terminador. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia de terminador pueden estar ubicadas flanqueando un segmento del genoma de virus influenza interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable es la señal de poliadenilación de SV40. Un vector de plásmido a modo de ejemplo es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.

Los vectores se introducen en células huésped que pueden soportar la replicación del virus influenza a partir de los promotores de vector, células huésped que son células Vero.

Entonces se hacen crecer en cultivo las células huésped que incluyen los vectores de influenza B en condiciones permisivas para la replicación y el ensamblaje de virus. Normalmente, las células huésped que incorporan los plásmidos de influenza B de la invención se cultivan a una temperatura por debajo de 37ºC, preferiblemente a una temperatura igual o inferior a 35ºC. Normalmente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32ºC y 35ºC. En algunas realizaciones, las células se cultivan a una temperatura de entre aproximadamente 32ºC y 34ºC, por ejemplo, a aproximadamente 33ºC. 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.

En el presente documento se dan a conocer 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 35ºC y recuperando virus influenza.

En determinadas realizaciones, se introducen una pluralidad de vectores de plásmido que incorporan segmentos genómicos de virus influenza en una población de células huésped. En determinadas realizaciones, se utilizan 8 plásmidos, que incorporan cada uno de ellos un segmento genómico diferente para introducir un genoma de influenza completo en las células huésped. Normalmente, los vectores de plásmido de la invención son vectores de expresión bidireccionales. Un vector de plásmido a modo de ejemplo de la invención es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.

En algunas realizaciones, los virus influenza corresponden a un virus influenza B. En algunas realizaciones, los virus influenza corresponden a un virus influenza A. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen recuperar virus influenza recombinantes y/o reordenantes que pueden provocar una respuesta inmunitaria tras la administración, por ejemplo, administración intranasal, a un sujeto. En algunas realizaciones, los virus se inactivan antes de la administración, en otras realizaciones, se administran virus atenuados vivos. También se dan a conocer virus influenza A e influenza B recombinantes y reordenantes producidos según los métodos de la invención.

En determinadas realizaciones, los virus incluyen 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. En una realización, el virus influenza incorpora un virus de la cepa de influenza B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, una cepa adaptada al frío, sensible a la temperatura, atenuada de B/Ann Arbor/1/66. En otra realización, el virus influenza incorpora un virus de la cepa de influenza A/Ann Arbor/6/60, por ejemplo, una cepa adaptada al frío, sensible a la temperatura, atenuada de A/Ann Arbor/6/60. En otra realización de la descripción, los virus son virus influenza modificados artificialmente por ingeniería genética que incorporan uno o más aminoácidos sustituidos que influyen en las propiedades biológicas características 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: $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G); y en un virus de la cepa B: $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V). De manera similar, otras sustituciones de aminoácido en cualquiera de estas posiciones que dan como resultado sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación están englobadas por los virus y métodos de la descripción.

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 relevante desde el punto de vista patógeno, tal como se realiza de manera rutinaria para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento HA 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, los siete segmentos génicos complementarios de la primera cepa se introducen en combinación con el segmento que codifica o bien para HA o bien para NA. En determinadas realizaciones, los segmentos génicos internos se derivan de la cepa de influenza B/Ann Arbor/1/66 o A/Ann Arbor/6/60.

En el presente documento también se dan a conocer 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 contra la gripe que incluyen tales virus influenza novedosos. En determinadas realizaciones, se produce virus de la cepa influenza A novedoso 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, $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34}. Por ejemplo, se introducen mutaciones en las posiciones de nucleótido $PB1^{1195}$, $PB1^{1766}$, $PB1^{2005}$, $PB2^{821}$ y NP^{146}, o en 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 da como resultado un 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 de la presente invención. Por ejemplo, se introducen favorablemente mutaciones seleccionadas de entre $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (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 una vacuna atenuada viva. Para aumentar la estabilidad del fenotipo deseado normalmente se introducen una pluralidad de mutaciones. Tras la introducción de la(s) mutación/mutaciones seleccionada(s) en el genoma de influenza, el genoma de influenza mutado se replica en condiciones en las que se produce el virus. Por ejemplo, el genoma de virus influenza mutado puede replicarse en huevos de gallina. Alternativamente, el genoma de virus influenza puede replicarse en cultivo celular. En este último caso, el virus se amplifica adicionalmente de manera opcional en huevos de gallina para aumentar el título. Los virus sensibles a la temperatura, y opcionalmente, atenuados y/o adaptados al frío producidos según los métodos dados a conocer en el presente documento también son una característica de la descripción, como lo son vacunas que incluyen tales virus. De manera similar, se dan a conocer ácidos nucleicos virales recombinantes novedosos que incorporan una o más mutaciones en las posiciones $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34}, por ejemplo, mutaciones seleccionadas de entre $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G), y polipéptidos con tales sustituciones de aminoácido.

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 $PB2^{630}$; PA^{431}; PA^{497}; NP^{55}; NP^{114}; NP^{410}; NP^{510}; $M1^{159}$ y $M1^{183}$ 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: $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V). Tal como se indicó anteriormente, las vacunas que incorporan tales virus, así como los ácidos nucleicos y polipéptidos que incorporan estas mutaciones y sustituciones de aminoácido son todos características de la descripción.

La descripción proporciona cepas de influenza que incluyen las mutaciones dadas a conocer en el presente documento, 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: $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34} o cualquier virus influenza B con una sustitución de aminoácido en relación con el tipo natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: $PB2^{630}$; PA^{431}; PA^{497}; NP^{55}; NP^{114}; NP^{410}; NP^{510}; $M1^{159}$ y $M1^{183}$, con la condición de que las cepas A/Ann Arbor/6/60 ca y B/Ann Arbor/1/66 no se consideren una característica de la presente invención. En determinadas realizaciones preferidas, los virus influenza A incluyen una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G); y los virus influenza B incluyen una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V), respectivamente.

En una realización, se introducen una pluralidad de vectores de plásmido que incorporan el genoma de virus

influenza en células huésped. Por ejemplo, pueden incorporarse segmentos de un genoma de virus influenza en al menos 8 vectores de plásmido. En una realización preferida, se incorporan 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 de virus influenza.

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

En la presente invención se emplean células huésped Vero que pueden soportar la replicación de virus influenza a partir de promotores de vector.

También se da a conocer el cultivo de células huésped que incorporan los plásmidos de la invención a una temperatura por debajo de 37ºC, preferiblemente a una temperatura igual o inferior a 35ºC. Normalmente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32ºC y 35ºC. En algunas realizaciones, las células se cultivan a una temperatura de entre aproximadamente 32ºC y 34ºC, por ejemplo, a aproximadamente 33ºC.

También se dan a conocer métodos novedosos 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) a partir de células Vero en cultivo. Se someten a electroporación una pluralidad de vectores que incorporan un genoma de virus influenza en una población de células Vero. Se hacen crecer las células en condiciones permisivas para la replicación viral, por ejemplo, en el caso de cepas de virus adaptado al frío, atenuado, sensible a la temperatura, se hacen crecer las células Vero a una temperatura por debajo de 37ºC, preferiblemente a una temperatura igual o inferior a 35ºC. Normalmente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32ºC y 35ºC. En algunas realizaciones, las células se cultivan a una temperatura de entre aproximadamente 32ºC y 34ºC, por ejemplo, a aproximadamente 33ºC. Opcionalmente (por ejemplo, para la producción de vacunas), se hacen crecer las células Vero en medio libre de suero sin ningún producto derivado de animal.

En los métodos dados a conocer anteriormente, se recuperan virus tras el cultivo de las células huésped que incorporan los plásmidos de genoma de influenza. En algunas realizaciones, los virus recuperados son virus recombinantes. En algunas realizaciones, los virus son virus influenza reordenantes que tienen contribuciones genéticas de más de una cepa original de virus. Opcionalmente, los virus recombinantes o reordenantes recuperados se amplifican adicionalmente mediante pases en células cultivadas o en huevos de gallina.

Opcionalmente, los virus recuperados se inactivan. En algunas realizaciones, los virus recuperados comprenden una vacuna contra la gripe. Por ejemplo, la vacuna contra la gripe recuperada pueden ser virus influenza reordenantes (por ejemplo, virus reordenantes 6:2 o 7:1) que tienen un antígeno HA y/o NA derivado de una cepa seleccionada de influenza A o influenza B. En determinadas realizaciones favorables, los virus influenza reordenantes tienen 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.

También se dan a conocer métodos para producir una vacuna de virus influenza recombinante que implica introducir 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, cultivar las células huésped a una temperatura inferior o igual a 35ºC, y recuperar un virus influenza que puede provocar una respuesta inmunitaria tras la administración a un sujeto. Las vacunas dadas a conocer en el presente documento pueden ser de virus de la cepa o bien influenza A o bien influenza B. En algunas realizaciones, los virus de la vacuna contra la gripe incluyen un virus influenza atenuado, un virus influenza adaptado al frío o un virus influenza sensible a la temperatura. En determinadas realizaciones, los virus presentan una combinación de estas propiedades deseables. En una realización, el virus influenza contiene un virus de la cepa de influenza A/Ann Arbor/6/60. En otra realización, el virus influenza incorpora un virus de la cepa de influenza B/Ann Arbor/1/66. Alternativamente, la vacuna incluye virus influenza A o virus influenza B modificados artificialmente por ingeniería genética 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 dadas a conocer en el presente documento incluyen virus influenza A recombinantes y reordenantes modificados artificialmente por ingeniería genética que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34} y virus influenza B recombinantes y reordenantes modificados artificialmente por ingeniería genética que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido

en una posición seleccionada de entre $PB2^{630}$, PA^{431}, PA^{497}, NP^{55}, NP^{114}, NP^{410}, NP^{510}, $M1^{159}$ y $M1^{183}$.

En algunas realizaciones, el virus incluye un virus influenza reordenante (por ejemplo, un reordenante 6:2 ó 7:1) que tiene segmentos de genoma viral derivados de más de una cepa de virus influenza. Por ejemplo, una vacuna de virus influenza reordenante incluye favorablemente un antígeno de superficie HA y/o NA derivado de una cepa seleccionada de influenza A o B, en combinación con los segmentos genómicos internos de una cepa de virus seleccionada por sus propiedades deseables con respecta a la producción de vacunas. A menudo, es deseable seleccionar la cepa de influenza 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 artificialmente por ingeniería genética 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 $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34} y virus influenza B que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre $PB2^{630}$, PA^{431}, PA^{497}, NP^{55}, NP^{114}, NP^{410}, NP^{510}, $M1^{159}$ y $M1^{183}$. Por ejemplo, los virus reordenantes favorables incluyen virus influenza A modificados artificialmente por ingeniería genética con una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas de entre $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G); y virus influenza B que incluyen una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas de entre $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V).

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

También se dan a conocer plásmidos que son vectores de expresión bidireccionales. Los vectores de expresión bidireccionales incorporan un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación, por ejemplo, un sitio de poliadenilación de SV40. En una realización, 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 es el plásmido pAD3000, ilustrado en la figura 1.

En algunas realizaciones, se inserta 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 descripción incluye un plásmido que tiene un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación de SV40, en el que el primer promotor y el segundo promotor están situados en orientaciones opuestas flanqueando al menos un segmento de un virus influenza.

También se dan a conocer kits que incluyen uno o más vectores de expresión de la invención. Normalmente, los kits también incluyen uno o más de: una línea celular que pueden soportar la replicación de virus influenza, un tampón, un medio de cultivo, un conjunto de instrucciones, un material de envasado y un recipiente. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad de vectores de expresión, incluyendo cada uno de ellos al menos un segmento de un genoma de virus influenza. Por ejemplo, los kits que incluyen una pluralidad de vectores de expresión incluyendo 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. 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 artificialmente por ingeniería genética que tiene una o más sustituciones de aminoácido tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la tabla 17. En una realización, el kit incluye un vector de expresión que incorpora elementos de una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican para antígenos HA y/o NA variantes.

También se dan a conocer cultivos celulares en crecimiento 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 35ºC. La composición también puede incluir un medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la pluralidad de vectores incluye vectores de expresión bidireccionales, 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 de la invención se mantienen a una temperatura inferior o igual a 35ºC, tal como entre aproximadamente 32ºC y 35ºC, normalmente entre aproximadamente 32ºC y aproximadamente 34ºC, por ejemplo, a aproximadamente 33ºC.

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

También se dan a conocer virus influenza recombinantes o reordenantes modificados artificialmente por ingeniería genética que incluyen una o más sustituciones de aminoácido que influyen en la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío y/o la atenuación. Por ejemplo, virus influenza A modificados artificialmente por ingeniería genética que tienen una o más sustituciones de aminoácido en una posición seleccionada de entre: $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34} y virus influenza B modificados artificialmente por ingeniería genética que tienen una o más sustituciones de aminoácido en una posición seleccionada de entre $PB2^{630}$, PA^{431}, PA^{497}, NP^{55}, NP^{114}, NP^{410}, NP^{510}, $M1^{159}$ y $M1^{183}$. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen virus influenza A con una cualquiera o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G); y virus influenza B con una cualquiera o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V). En determinadas realizaciones, los virus incluyen 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, se dan a conocer virus influenza A modificados artificialmente por ingeniería genética que tienen sustituciones de aminoácido en las cinco posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E5881G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G) y virus influenza B modificados artificialmente por ingeniería genética que tienen sustituciones de aminoácido en ocho o las nueve de las posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V). Además, los virus pueden incluir una o más sustituciones de aminoácido adicionales no enumeradas anteriormente.

En determinadas realizaciones, los virus influenza A modificados artificialmente por ingeniería genética son 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 presenta normalmente una reducción de entre aproximadamente 2,0 y 5,0 log_{10} en el crecimiento a 39ºC 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_{10}, al menos aproximadamente 3,0 log_{10}, al menos aproximadamente 4,0 log_{10} o al menos aproximadamente 4,5 log_{10} en el crecimiento a 39ºC 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 33ºC. Un virus influenza atenuado de la invención presenta normalmente una reducción de entre aproximadamente 2,0 y 5,0 log10 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_{10}, con frecuencia de aproximadamente 3,0 log_{10} y favorablemente de al menos aproximadamente 4,0 log_{10} en el crecimiento en un ensayo de atenuación en hurones en relación con el virus influenza de tipo natural.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ilustración del plásmido pAD3000

Figura 2: Micrografías de células infectadas

Figura 3: Análisis de genotipado de los virus reordenantes rMDV-A y H1N1 6:2 a partir de transfección con plásmidos.

Figura 4: Ilustración de un sistema de ocho plásmidos para la producción de virus influenza B.

Figura 5: A y B. Caracterización de virus MDV-B recombinante 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 MDV-B y ocho plásmidos.

Figura 8: Productos de RT-PCR derivados de amplificación simultánea de segmentos HA y NA de cepas de influenza B.

Figura 9: Gráfico de barras que ilustra títulos relativos de virus recombinante y reordenante.

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 (activación) que se correlacionan con sensibilidad a la temperatura (panel izquierdo) y títulos relativos a temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura) (panel derecho).

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

Figura 13: Ilustración esquemática de recombinantes de genes triples con residuos de tipo natural en proteínas PA, NP y M1.

Figura 14: Tabulación del crecimiento de virus recombinantes de genes individuales y genes dobles.

Figura 15: Tabulación de residuos de aminoácido de la nucleoproteína correspondientes a fenotipo no ts.

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

Figura 17: Gráfico de barras que ilustra títulos relativos a 33ºC y 39ºC.

Figura 18: Fotomicrografías que ilustran la morfología de placas de mutantes PR8 a diversas temperaturas. Se infectaron células MDCK con virus tal como se indica y se incubaron a 33, 37 y 39ºC 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 ó 39ºC durante la noche. Se sometieron a electroforesis polipéptidos radiomarcados en un SDS-PAGE y se sometieron a autorradiografía. Se indican las proteínas virales, HA, NP, M1 y NS.

Figura 20: A. Gráficos de líneas que ilustran la replicación diferencial de MDV-A y MDV-B en células Per.C6 en relación con la replicación en células MDCK; B. Gráfico de líneas que ilustra la replicación diferencial de reordenantes génicos individuales de MDV-A en células Per.C6.

Descripción detallada

La invención se expone en las reivindicaciones. Muchas cepas de virus influenza patógenas sólo crecen escasamente en cultivo tisular, y no se han hecho crecer satisfactoriamente 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) en células cultivadas para la producción comercial. La presente invención proporciona un sistema de transfección con múltiples plásmidos que permite el crecimiento y la recuperación de cepas de virus influenza que no están adaptadas para crecer en condiciones de cultivo celular convencionales.

En un primer aspecto, los métodos de la invención proporcionan vectores y métodos para producir un virus influenza B recombinante en cultivo celular completamente a partir de ADN viral clonado. También se dan a conocer métodos basados 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. Los virus influenza se producen 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 35ºC. 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 dados a conocer en el presente documento, pueden producirse en cultivo tisular de manera rápida y eficaz 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 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 única cepa de virus donador maestro (MDV) 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. La presente descripción aclara las mutaciones subyacentes que dan como resultado los fenotipos ca, ts y att de estas cepas de virus, y proporciona métodos para producir cepas de influenza novedosas 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 (MDV-A) seleccionado, o un virus donador maestro de

tipo B (MDV-B), 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 cualquiera de las secuencias de MDV-A o MDV-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 el ARN genómico viral puede transcribirse a partir de un promotor de ARN polimerasa I (pol I) de una hebra y los ARNm virales pueden sintetizarse a partir de un promotor de ARN polimerasa II (pol II) de la otra hebra. Opcionalmente, puede modificarse cualquier segmento génico, incluyendo el segmento HA (por ejemplo, para eliminar el sitio de escisión multibásico).

Entonces se recupera el virus MDV-A o MDV-B recombinante infeccioso tras la transfección de plásmidos que portan los ocho ADNc virales en células huésped apropiadas, por ejemplo, células Vero, MDCK/293T o MDCK/COS7 cocultivadas. Usando los plásmidos y métodos descritos en el presente documento, la invención es útil, por ejemplo, para generar vacunas contra la gripe reordenantes 6:2 mediante la cotransfección de los 6 genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) de los virus seleccionados (por ejemplo, MDV-A, MDV-B) junto con el HA y NA derivado de virus influenza de tipo (A o B) correspondientes diferentes. Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B relevante desde el punto de vista patógeno, tal como se realiza de manera rutinaria para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento HA puede seleccionarse de una cepa con importancia 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 MDV y cualquiera del gen de HA o NA de una cepa seleccionada (reordenantes 7:1). Además, este sistema es útil para determinar la base molecular de las características fenotípicas, por ejemplo, los fenotipos atenuado (att), adaptado al frío (ca) y sensible a la temperatura (ts), relevantes para la producción de vacunas.

Definiciones

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

Los términos “ácido nucleico”, “polinucleótido”, “secuencia de polinucleótido” y “secuencia de ácido nucleico” se refieren a polímeros de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, o quimeras o análogos de los mismos. Tal como se usan 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 los nucleótidos naturales porque se hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de manera similar a los nucleótidos que se producen de manera natural (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular de esta invención engloba secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente.

El término “gen” se usa ampliamente 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 a un ARNm codificado por esa secuencia genómica.

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 o tipos de tejido o tipo o tipos de células específico(s).

El término “vector” se refiere a los medios mediante los cuales puede propagarse y/o transferirse un ácido nucleico entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones 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 poli-lisina, un ADN o ARN conjugado con péptidos, un ADN conjugado con liposomas, o similares, que no son de replicación autónoma. Lo más comúnmente, los vectores de la presente invención son plásmidos.

Un “vector de expresión” es un vector, tal como un plásmido, que puede promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Normalmente, el ácido nucleico que va a expresarse puede estar “operativamente unido” a un promotor y/o potenciador, y someterse al control de regulación de la transcripción por el promotor y/o potenciador.

Un “vector de expresión bidireccional” normalmente se caracteriza por dos promotores alternativos orientados en sentidos opuestos en relación con un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de manera que puede

iniciarse la expresión en ambas orientaciones dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de ARN tanto de hebra positiva (+) o sentido, como 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 (tal como un ARNc) se expresan a partir de la misma hebra.

En el contexto de la invención, el término "aislado", se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de los componentes que normalmente le 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 situado en una ubicación en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativa con respecto a 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 con respecto a ese ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos también se denominan ácidos nucleicos "heterólogos".

El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) que se ha alterado artificial o sintéticamente (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración puede realizarse en el material dentro de, 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 mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

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

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

El término "célula huésped" significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y que 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 procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio, ave o mamífero, incluyendo células humanas. Células huésped a modo de ejemplo en el contexto de la invención son células Vero (de riñón de mono verde africano). También se dan a conocer células Per.C6 (células retinianas embrionarias humanas), células BHK (de riñón de cría de hámster), células primarias de riñón de pollo (PCK), células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T) y células COS (por ejemplo, células COS1, COS7). El término célula huésped engloba combinaciones o mezclas de células incluyendo, por ejemplo, cultivos mixtos de diferentes tipos celulares o líneas celulares.

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 mayor en el título a 37ºC en relación con 33ºC para cepas de influenza A, y que el virus presenta una reducción de 100 veces o mayor en el título a 37ºC en relación con 33ºC para cepas de influenza B. Por ejemplo, el término "adaptado al frío" ("ca") indica que el virus presenta crecimiento a 25ºC dentro de 100 veces su crecimiento a 33ºC. Por ejemplo, el término "atenuado" ("att") indica que el virus se replica en las vías respiratorias superiores de hurones, pero no es detectable en tejidos pulmonares, y no produce enfermedad de tipo gripe en el animal. Se entenderá que los virus con fenotipos intermedios, es decir, virus que presentan reducciones del título inferiores a 100 veces a 39ºC (para virus de la cepa A) o 37ºC (para virus de la cepa B), que presentan crecimiento a 25ºC que es más de 100 veces su crecimiento a 33ºC (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 de tipo gripe reducida en el animal, que poseen una o más de las sustituciones de aminoácido descritas en el presente documento también son virus útiles englobados por la invención. El crecimiento indica la cantidad viral tal como se indica mediante el título, el tamaño o la morfología de placas, la densidad de partículas u otras medidas conocidas por los expertos en la técnica.

La expresión "modificado artificialmente por ingeniería genética" se usa en el presente documento para indicar que

el virus, el ácido nucleico viral o el producto codificado viralmente, por ejemplo, un polipéptido, una vacuna, comprende al menos una mutación introducida mediante métodos recombinantes, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por PCR, etc. La expresión "modificado artificialmente por ingeniería genética" cuando se hace referencia a un virus (o componente o producto viral) que comprende una o más mutaciones de nucleótido y/o sustituciones de aminoácido indica que el genoma viral o segmento genómico que codifica para el virus (o componente o producto viral) no se deriva de fuentes que se producen de manera natural, tales como una cepa de laboratorio existente previamente o que se produce de manera natural de virus producido mediante métodos no recombinantes (tales como pases progresivos a 25ºC), por ejemplo, una cepa A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66 de tipo natural o adaptada al frío.

Virus influenza

El genoma de los virus influenza está compuesto por ocho segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de hebra lineal (-) que codifica para las proteínas inmunogénicas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y seis polipéptidos centrales internos: la nucleoproteína de la nucleocápsida (NP); proteínas de la matriz (M); proteínas no estructurales (NS); y 3 proteínas ARN polimerasas (PA, PB1, PB2). Durante la replicación, el ARN viral genómico se transcribe dando lugar a ARN mensajero de hebra (+) y ARNc genómico de hebra (-) en el núcleo de la célula huésped. Cada uno de los ocho segmentos genómicos se empaqueta en complejos de ribonucleoproteínas que contienen, además del ARN, NP y un complejo de polimerasa (PB1, PB2 y PA).

El ARN genómico viral correspondiente a cada uno de los ocho segmentos se inserta 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. 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 del plásmido. Un vector a modo de ejemplo, el plásmido pAD3000, se ilustra en la figura 1.

Lo más comúnmente, los vectores de plásmido de la invención son vectores de expresión bidireccionales que pueden iniciar la transcripción del segmento genómico viral insertado en cualquier sentido, es decir, dando lugar a moléculas de ARN viral tanto de hebra (+) como de hebra (-). Para efectuar la transcripción bidireccional, se inserta cada uno de los segmentos genómicos virales en un vector que tiene al menos dos promotores independientes, de manera que se transcriben copias de ARN genómico 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 se disponen 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. Alternativamente, puede emplearse un vector "ambisentido" en el que se transcriben el ARNm de hebra (+) y el ARN viral de hebra (-) (como ARNc) a partir de la misma hebra del vector.

Vectores de expresión

El segmento genómico del 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. Una variedad de promotores son adecuados para su uso en vectores de expresión para regular la transcripción de segmentos genómicos del virus influenza. En determinadas realizaciones, por ejemplo, en las que 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 condicionada, pueden sustituirse otros promotores que inducen transcripción de 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), papilomavirus, virus de la hepatitis B, poliomavirus y virus de simio 40 (SV40), y diversos promotores retrovirales. Los promotores de mamífero incluyen, entre muchos otros, el promotor de actina, promotores de inmunoglobulina, promotores de choque térmico, y similares. Además, pueden emplearse promotores de bacteriófagos conjuntamente con la ARN polimerasa relacionada, por ejemplo, el promotor de T7.

La transcripción se aumenta opcionalmente incluyendo una secuencia potenciadora. Los potenciadores normalmente son elementos de ADN de actuación en cis cortos, por ejemplo de 10-500 pb, que actúan en colaboración con un promotor para aumentar la transcripción. Se han aislado muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (hemoglobina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina) y virus de células eucariotas. El potenciador puede someterse a corte y empalme 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 de potenciación de la transcripción adicionales se eligen para optimizar la expresión en el tipo de célula huésped en el que va a introducirse el ADN heterólogo (Scharf *et al*. (1994) Heat stress promotors 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 la iniciación de la traslocación.

Los vectores de la descripción 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 de terminación. 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. En una realización, por ejemplo, que implica el plásmido pAD3000, las secuencias de poliadenilación de SV40 proporcionan una señal de poliadenilación.

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 de resistencia a neomicina son adecuados para la selección en cultivo de células eucariotas.

Puede emplearse el vector que contiene la secuencia de ADN apropiada tal como se describió anteriormente, así como una secuencia de control o promotora apropiada, para transformar una célula huésped permitiendo la expresión de la proteína. Aunque los vectores de la descripción pueden replicarse en células bacterianas, lo más frecuentemente será deseable introducirlos en células de mamífero, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293, células COS, para el fin de expresión.

Elementos de expresión adicionales

Lo más comúnmente, el segmento genómico que codifica para una proteína de virus influenza incluye cualquier secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo traducción dando lugar a una proteína viral funcional. En otras situaciones, puede emplearse un minigén, u otro constructo artificial que codifica para las proteínas virales, por ejemplo, una proteína HA o NA. En este caso, a menudo es deseable incluir señales de iniciación específicas que ayudan en la traducción eficaz de la secuencia codificante heteróloga. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Para garantizar la traducción de todo el inserto, se inserta el codón de iniciación en el marco de lectura correcto en relación con la proteína viral. Los codones de iniciación y elementos de transcripción 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 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 a los medios de cultivo celular. Tales secuencias las conocen los expertos e incluyen péptidos líder de secreción, secuencias de direccionamiento a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en el RE, secuencias de tránsito mitocondrial), secuencias de ubicación/anclaje en la membrana (por ejemplo, secuencias de detención de la transferencia, secuencias de anclaje GPI), y similares.

Vacuna de virus influenza

Históricamente, las vacunas de virus influenza se han producido en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionadas basándose en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus reordenantes que incorporan antígenos seleccionados de hemaglutinina y neuraminidasa 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 recupera el virus influenza y, opcionalmente, se inactiva, por ejemplo, usando formaldehído y/o β-propiolactona. Sin embargo, la producción de la vacuna contra la gripe de este modo tiene varios inconvenientes significativos. Los contaminantes que quedan de los huevos de gallina son altamente antigénicos, pirógenos, y frecuentemente dan como resultado efectos secundarios significativos tras la administración. Y lo que es más importante, las cepas designadas para la producción deben seleccionarse y distribuirse normalmente meses antes de la siguiente temporada de gripe para dar tiempo para la producción e inactivación de la vacuna contra la gripe. Los intentos de producir vacunas recombinantes y reordenantes en cultivo celular se han visto obstaculizados por la incapacidad de cualquiera de las cepas aprobadas para la producción de vacunas para crecer de manera eficaz en condiciones de cultivo celular convencionales.

Se da a conocer un sistema de vectores, y métodos para producir virus recombinantes y reordenantes en cultivo que posibilitan producir rápidamente vacunas correspondientes a una o muchas cepas antigénicas seleccionadas de virus. En particular, se proporcionan condiciones y cepas que dan como resultado la producción eficaz de virus a partir de un sistema de múltiples plásmidos en cultivo celular. Opcionalmente, si se desea, los virus pueden amplificarse adicionalmente 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

cultivo celular convencionales, por ejemplo, a 37ºC. En los métodos de la presente invención, se introducen múltiples plásmidos, que incorpora 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 35ºC. Normalmente, los cultivos se mantienen a entre aproximadamente 32ºC y 35ºC, preferiblemente entre aproximadamente 32ºC y aproximadamente 34ºC, por ejemplo, a aproximadamente 33ºC.

Normalmente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como un incubador de cultivo celular, con humedad y CO_2 controlados, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para garantizar que la temperatura no supera los 35ºC.

Pueden obtenerse fácilmente virus influenza reordenantes introduciendo un subconjunto de vectores correspondientes a segmentos genómicos de un virus influenza maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de 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, puede seleccionarse la cepa de virus donador maestro para un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura. En este contexto, se seleccionan favorablemente 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 seleccionables, por ejemplo, una cepa atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, tal como una cepa de influenza A modificada artificialmente por ingeniería genética tal como se describe en el ejemplo 4; o una cepa de influenza B modificada artificialmente por ingeniería genética que incorpora una o más de las sustituciones de aminoácido especificadas en la tabla 17, como cepas donadoras maestras.

En una realización, se transfectan 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 prevé que provoca una 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 o inferior a 35ºC, tal como entre aproximadamente 32ºC y 35ºC, por ejemplo entre aproximadamente 32ºC y aproximadamente 34ºC, o a aproximadamente 33ºC, se recuperan virus reordenantes. Opcionalmente, el virus recuperado puede inactivarse usando un agente de desnaturalización tal como formaldehído o β-propiolactona.

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

En un aspecto, la presente descripción se basa en la determinación de las mutaciones que subyacen al fenotipo ts en las cepas donadoras maestras preferidas del virus. Para determinar la importancia funcional de cambios de un único nucleótido en el genoma de la cepa MDV, se evaluaron virus reordenantes derivados de cepas altamente relacionadas dentro del linaje A/AA/6/60 para determinar su sensibilidad a la temperatura. La naturaleza isogénica de las dos cepas originales permite la evaluación de cambios de un único nucleótido sobre el fenotipo ts. Por consiguiente, se mapea la base genética para el fenotipo ts de MDV-A al nivel de nucleótidos para determinar residuos de aminoácido específicos dentro de PB1, PB2 y NP.

Los intentos anteriores de mapear la base genética del fenotipo ts de A/AA/6/60 ca utilizaron técnicas clásicas de coinfección/reordenantes para crear genes reordenantes únicos y múltiples entre A/AA/6/60 y una cepa de tipo natural 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 44:443-4560; 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 los efectos de constelación, que se producían mezclando segmentos génicos de dos cepas de influenza A divergentes. Podían haberse producido interacciones debilitadas a través de cambios entre los segmentos génicos A/AA/6/60 y de tipo natural distintos a los implicados específicamente en la expresión del fenotipo ts a partir del antecedente de A/AA/6/60. También se mostró que los efectos de constelación confundían la interpretación de la asociación del segmento génico M con el fenotipo att (Subbarao *et al*. (1992) The attenuation fenotype conferred by the M gene of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted virus (H2N2) on the A/Korea/82 (H3N2) reassortant virus results from a gene constellation effect, Virus Res 25:37-50).

Las mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácido en las posiciones $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34} se identifican como funcionalmente importantes a la hora de conferir el fenotipo sensible a la temperatura en el virus de la cepa MDV-A. Tal como entenderán los expertos en la técnica, las mutaciones en

nucleótidos en las posiciones $PB1^{1195}$, $PB1^{1766}$, $PB1^{2005}$, $PB2^{821}$ y NP^{146} designan sustituciones de aminoácido en $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34}, respectivamente. Por tanto, se da a conocer cualquier sustitución de nucleótido que da como resultado aminoácidos sustituidos en estas posiciones. Las mutaciones a modo de ejemplo $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G), de manera individual, 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 en un antecedente de tipo natural da como resultado un virus con un fenotipo ts. De manera consecuente con la estabilidad de estos fenotipos durante el pase del virus, ningún cambio único puede revertir de manera individual el perfil de sensibilidad a la temperatura del virus resultante con respecto al del tipo natural. Más bien, estos cambios parecen actuar unos en colaboración con los otros 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 contra la gripe atenuadas vivas.

Las sustituciones de aminoácidos individuales en una cepa B de virus donador maestro 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 $PB2^{630}$; PA^{431}; PA^{497}; NP^{55}; NP^{114}; NP^{410}; NP^{510}; $M1^{159}$ y $M1^{183}$ 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: $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V).

La descripción proporciona cepas de influenza que incluyen las mutaciones dadas a conocer en el presente documento, 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: $PB1^{391}$, $PB1^{581}$, $PB1^{661}$, $PB2^{265}$ y NP^{34} o cualquier virus influenza B con una sustitución de aminoácido en relación con el tipo natural en una o más posiciones seleccionadas de entre: $PB2^{630}$; PA^{431}; PA^{497}; NP^{55}; NP^{114}; NP^{410}; NP^{510}; $M1^{159}$ y $M1^{183}$, con la condición de que las cepas A/Ann Arbor/6/60 ca y B/Ann Arbor/1/66 no se consideren una característica de la presente invención. En determinadas realizaciones preferidas, los virus influenza A incluyen una pluralidad de mutaciones (por ejemplo, dos, o tres, o cuatro, o cinco, o más mutaciones) seleccionadas de entre $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G), $PB1^{661}$ (A661T), $PB2^{265}$ (N265S) y NP^{34} (D34G); y los virus influenza B incluyen una pluralidad de mutaciones seleccionadas de entre $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{183}$ (M183V), respectivamente. Por ejemplo, además de proporcionar virus con fenotipos deseados relevantes para la producción de vacunas, los virus con un subconjunto de mutaciones, por ejemplo, 1, o 2, o 3, o 4, o 5 mutaciones seleccionadas, son útiles en aclarar la contribución de mutaciones adicionales al fenotipo del virus. En determinadas realizaciones, los virus influenza incluyen al menos un nucleótido adicional no de tipo natural (por ejemplo, que da como resultado posiblemente una sustitución de aminoácido adicional), que depura opcionalmente el fenotipo deseado o confiere un atributo fenotípico deseable adicional.

Cultivo celular

Normalmente, la propagación del virus se lleva a cabo en las composiciones de medios en que la célula huésped se cultiva comúnmente. 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. Comúnmente, se emplean cocultivos que incluyen dos de las líneas celulares anteriores, por ejemplo, células MDCK y o bien células 293T o bien células COS a una razón, por ejemplo, de 1:1, para mejorar la eficacia de replicación. Normalmente, las células se cultivan 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, a concentración de CO_2 y humedad controladas, adecuado para mantener el pH tamponado neutro (por ejemplo, a pH de entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para evitar el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomicina 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.

Se han notificado extensamente procedimientos para mantener células de mamífero en cultivo y los conocen 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, Ámsterdam. Los detalles adicionales en cuanto a procedimientos de cultivo tisular de particular interés en la producción de virus influenza *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten *et al.* (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. En Cohen and Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines, que se incorpora en el presente documento en su totalidad. 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 B 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, en tubos o frascos de cultivo o en grandes frascos con agitación, en botellas giratorias o en perlas microportadoras (por ejemplo, perlas microportadoras de DEAE-Dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-trimetilamina, tales como 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 una gran área superficial para el crecimiento celular adherente por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un solo 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. Los biorreactores están disponibles en volúmenes de desde menos de 1 litro hasta más de 100 litros, por ejemplo, biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores a escala de laboratorio y comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, en el contexto de la presente invención, es importante que los cultivos se mantengan a una temperatura inferior o igual a 35ºC, para garantizar la recuperación eficaz del 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 de entre aproximadamente 32ºC y 35ºC, normalmente a una temperatura de entre aproximadamente 32ºC y aproximadamente 34ºC, habitualmente a aproximadamente 33ºC.

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 35ºC durante el periodo de replicación del virus.

Introducción de vectores en células huésped

Se introducen favorablemente vectores de plásmido que incorporan un virus influenza B en células Vero usando electroporación según el siguiente procedimiento. En resumen, se resuspenden 5 x 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 mezclan suavemente mediante ligeros 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. Se vuelven a mezclar las células mediante ligeros golpes y aproximadamente 1-2 minutos tras la electroporación se añaden 0,7 ml de MEM con FBS al 10% directamente a la cubeta. Entonces se transfieren las células a dos pocillos de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos convencional que contiene 2 ml de MEM, FBS al 10% u OPTI-MEM sin suero. Se lava la cubeta para recuperar cualquier célula restante y se divide la suspensión de lavado entre los dos pocillos. El volumen final es de aproximadamente 3,5 ml. Entonces se incuban las células en condiciones permisivas para el crecimiento viral, por ejemplo, a aproximadamente 33ºC para las cepas adaptadas al frío.

Recuperación de virus

Normalmente se recuperan los virus del medio de cultivo, en el que se han hecho crecer células infectadas (transfectadas). Normalmente se clarifica medio en bruto antes de la concentración de los virus influenza. Los métodos comunes incluyen filtración, ultrafiltración, adsorción en sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, en primer lugar puede clarificarse el medio en bruto procedente de cultivos infectados mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para retirar 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 µm para retirar las células intactas y otra materia particulada grande. Opcionalmente, se centrifuga entonces el sobrenadante del medio clarificado 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 en sacarosa (60%-12%) o tartrato de potasio (50%-10%). Son adecuados gradientes o bien continuos o bien por etapas, por ejemplo, un gradiente de sacarosa de entre el 12% y el 60% en cuatro etapas del 12%. Los gradientes se centrifugan a una velocidad y durante un tiempo suficientes para que los virus se concentren en una banda visible para su recuperación. Alternativamente, y para la mayoría de las aplicaciones comerciales a gran escala, virus se somete a elutriación en gradientes de densidad usando un rotor de centrífuga 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 tisular, 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 la patente estadounidense n.º 5.690.937. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80ºC en presencia de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) como estabilizador.

Métodos y composiciones para la administración profiláctica de vacunas

Los virus recombinantes y reordenantes dados a conocer en el presente documento pueden administrarse 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 alantoideo procedente de huevos de gallina no infectados (es decir, líquido alantoideo normal "NAF") o combinaciones de los mismos. La preparación de tales disoluciones garantizando esterilidad, pH, isotonicidad y estabilidad se efectúa según protocolos establecidos en la técnica. Generalmente, se selecciona un portador o excipiente para minimizar los efectos alérgicos u otros no deseados, y para adecuarse a la vía de administración particular, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

Generalmente, los virus influenza de la descripción se administran en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas de virus influenza. Preferiblemente, la administración de 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 HID_{50} (dosis infecciosa humana), es decir, aproximadamente 10^5 - 10^8 ufp (unidades formadoras de placas) por dosis administrada. Alternativamente, se administran aproximadamente 10-50 µg, por ejemplo, aproximadamente 15 µg de HA sin un adyuvante, administrándose dosis más pequeñas con un 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 tiempo 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 una jeringa, 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 el tracto respiratorio superior. 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 en la mucosa en el sitio de entada del virus influenza. Para la administración intranasal, a menudo se prefieren vacunas de virus vivo atenuado, por ejemplo, un virus influenza 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 vía o una diferente, para lograr el efecto profiláctico deseado.

Alternativamente, puede estimularse una respuesta inmunitaria mediante la 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. Entonces se transfieren las células al sujeto que va a vacunarse mediante métodos de trasplante intravenoso convencionales.

Opcionalmente, la formulación para la administración profiláctica del virus influenza, o subunidades del mismo, también contiene uno o más adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria 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 hidrocarburo, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum* y los adyuvantes sintéticos QS-21 y MF59.

Si se desea, la administración profiláctica 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 inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de colonias (CSF) de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando de Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que el 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.

En otra realización, los vectores de la descripción 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, se inserta el ácido nucleico heterólogo en una región no esencial de un gen o segmento génico, por ejemplo, el gen M del segmento 7. La secuencia de polinucleótido heteróloga puede codificar para un polipéptido o péptido, o para un ARN tal como un ARN antisentido o ribozima. Entonces se introduce el ácido nucleico heterólogo en un huésped o en células huésped produciendo virus recombinantes que incorporan el ácido nucleico heterólogo, y se administran los virus tal como se describió anteriormente.

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

Alternativamente, pueden administrarse los virus que comprenden un ácido nucleico heterólogo 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 hepáticas, células neuronales (incluyendo, cerebro), células renales, células uterinas, células musculares, células intestinales, células de cuello uterino, 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 mediante administración de las partículas virales directamente al sitio o sitios de interés mediante una variedad de métodos, incluyendo inyección (por ejemplo, usando una ajuga o jeringa), administración de vacuna sin aguja, administración tópica, o presionando contra un sitio de tejido, órgano o piel. Por ejemplo, las partículas de vector viral pueden administrarse 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 organismo, por ejemplo, durante cirugía.

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 (o 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 unido operativamente 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 único vector o virus. Por ejemplo, además de un polinucleótido que codifica para un polipéptido o ARN 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 y similares.

Los métodos y vectores dados a conocer 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, debidas a virus, bacterias y similares.

Kits

Para facilitar el uso de los vectores y sistemas de vectores dados a conocer en el presente documento, puede envasarse cualquiera de los vectores, por ejemplo, plásmidos de virus influenza consenso, plásmidos de polipéptido de influenza variantes, plásmidos de biblioteca de polipéptidos de influenza, etc., y componentes adicionales tales como tampón, células, medio de cultivo, útiles para el envasado y la infección del virus influenza para fines experimentales o terapéuticos, 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 de la invención, material de envasado, y un recipiente.

Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas virales

Pueden manipularse ácidos nucleicos y/o proteínas de virus influenza según técnicas de biología molecular bien conocidas. Protocolos detallados para numerosos de tales procedimientos, incluyendo amplificación, clonación, mutagénesis, transformación, y similares, se describen, 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 mediante Qβ-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; Kwoh *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 Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13:563. Los métodos adicionales, útiles para clonar ácidos nucleicos en el contexto de la presente invención, incluyen Wallace *et al*., patente estadounidense n.º 5.426.039. Métodos mejorados de amplificación de ácidos nucleicos grandes mediante PCR se resumen en Cheng *et al*. (1994) Nature 369:684 y las referencias en el mismo.

Pueden sintetizarse determinados polinucleótidos, por ejemplo, oligonucleótidos, utilizando diversas estrategias en fase sólida incluyendo química de acoplamiento con fosforamidita basada en mononucleótidos y/o trinucleótidos. 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) Met Enzymol 211:3.

En lugar de sintetizar las secuencias deseadas, puede encargarse a medida esencialmente cualquier ácido nucleico de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (mcrc@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 realizarse 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 correlacionadas funcionalmente con una característica fenotípica deseable, 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. Los métodos para la mutagénesis dirigida al sitio se conocen bien en la técnica, 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.

Los ejemplos 1-8 y 10 son ejemplos de referencia.

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 de crecimiento bovina (BGH) por secuencias señal de poliadenilación derivadas de virus de simio 40 (SV40).

Se amplificaron secuencias derivados de SV40 con Taq MasterMix (Qiagen) usando los siguientes oligonucleótidos, designados en el sentido de 5' a 3':

poliA.1: AACAATTGAGATCTCGGTCACCTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT (SEQ ID NO: 1)

poliA.2: TATAACTGCAGACTAGTGATATCCTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTA (SEQ ID NO: 2)

Se usó el plásmido pSV2His como molde. Se obtuvo un fragmento compatible con el producto de 175 pb pronosticado y se clonó en pcDNA3.1, usando un vector de clonación Topo TA (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Se escindió el fragmento de 138 pb deseado que contenía las señales de poliadenilación de SV40 del plásmido resultante con EcoRV y BstEII, se aisló en un gel de agarosa y se ligó entre los sitios 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 la cepa 777 de SV40 (AF332562).

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

Se ha usado comúnmente una variante A/AA/6/60 de cepa de tipo A de virus influenza adaptado 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 (MDV) a modo de ejemplo en el contexto de la presente invención. Por simplicidad, esta variante A/AA/6/60 de cepa se designa en el presente documento MDV-A. Se extrajo el ARN viral de MDV-A usando el kit RNeasy mini (Qiagen) y se amplificaron los ocho fragmentos de ADNc correspondientes mediante RT-PCR usando los cebadores enumerados en la tabla 1.

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

SEQ ID.	Cebador	Secuencia (5'-3')

	CEBADORES DIRECTOS DE MDV-A	
SEQ ID NO: 3	AarI PB2 largo	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC GAA AGC AGG TC
SEQ ID NO: 4	BsmBI-PB1	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC AAA
SEQ ID NO: 5	BsmBI-PA	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT ACT
SEQ ID NO: 6	BsmBI-NP	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TAG A
SEQ ID NO: 7	AarI HA-largo	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC AAA AGC AGG GG
SEQ ID NO: 8	BsmBI-NA	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGA GTG A
SEQ ID NO: 9	BsmBI-M	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGT AGA T
SEQ ID NO: 10	BsmBI-NS	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TGA
	CEBADORES INVERSOS DE MDV-A	
SEQ ID NO: 11	AarI PB2-largo	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGT CGT TT
SEQ ID NO: 12	BsmBI-PB1	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
SEQ ID NO: 13	BsmBI-PA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
SEQ ID NO: 14	BsmBI-NP	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT
SEQ ID NO: 15	AarI HA-largo	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGG TGT T
SEQ ID NO: 16	BsmBI-NA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAG TTT
SEQ ID NO: 17	BsmBI-M	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA GTT
SEQ ID NO: 18	BsmBI-NS	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT

Con la excepción de los segmentos genómicos 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 ambos fragmentos de ADNc de AarI y BsmB I entre los dos sitios BsmB I del vector pAD3000.

El análisis de secuenciación reveló que todos los fragmentos de ADNc clonados contenían mutaciones con respecto a la secuencia de MDV-A consenso, que se introdujeron probablemente 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 MDV-A en pAD3000

Segmento génico	Posiciones de mutación (nt)	Cambios de aminoácidos
PB2	A954(G/C/T), G1066A, T1580C, T1821C	Silenciosa, de Gly a Ser, de Val a Ala, Silenciosa
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, silenciosa
NA	C1422T	De Pro a Leu
M	A191G	De Thr a Ala
NS	C38T	Silenciosa

Todas las mutaciones se corrigieron de nuevo a la secuencia de MDV-A consenso usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) y cebadores de oligonucleótido sintéticos tal como se muestra en la tabla 3.

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

	HJ67	PB2A954G	5/P/gcaagctgtggaaatatgcaaggc (SEQ ID NO: 19)
	HJ68	PB2A954G.as	gccttgcatatttccacagcttgc (SEQ ID NO: 20)
	HJ69	PB2G1066A	5/P/gaagtgcttacgggcaatcttcaaac (SEQ ID NO: 21)
PB2	HJ70	PB2G1066A.as	gtttgaagattgcccgtaagcacttc (SEQ ID NO: 22)
	HJ71	PB2T1580A	5/P/cctgaggaggtcagtgaaacac (SEQ ID NO: 23)
	HJ72	PB2T1580A.as	gtgtttcactgacctcctcagg (SEQ ID NO: 24)
	HJ73	PB21821C	5/P/gtttgttaggactctattccaac (SEQ ID NO: 25)
	HJ74	PB21821C.as	gttggaatagagtcctaacaaac (SEQ ID NO: 26)
PB1	HJ75	PB1C1117T	gacagtaagctccgaacacaaatac (SEQ ID NO: 27)
	HJ76	PB1C1117T.as	gtatttgtgttcggagcttcatgc (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/cagagaaggtagatttgacgactg (SEQ ID NO: 31)
	HJ80	PA-A1163G.as	cagtcgtcaaagtctaccttctctg (SEQ ID NO: 32)
PA	HJ81	PA-A1615G	5/P/cactgacccaagacttgagccac (SEQ ID NO: 33)
	HJ82	PA-A1615G.as	gtggctcaagtcttgggtcagtg (SEQ ID NO: 34)

	HJ83	PA-T1748C	5/P/caaagattaaaatgaaatggggaatg (SEQ ID NO: 35)
	HJ84	PA-T1748C.as	cattccccatttcattttaatctttg (SEQ ID NO: 36)
	HJ85	PA-C2229	5/P/gtaccttgtttctactaataacccgg (SEQ ID NO: 37)
	HJ86	PA-C2230.as	ccgggttattagtagaaacaaggtac (SEQ ID NO: 38)
	HJ87	HA-A902C	5/P/ggaacacttgagaactgtgagacc (SEQ ID NO: 39)
HA	HJ88	HA-A902C.as	ggtctcacagttctcaagtgttcc (SEQ ID NO: 40)
	HJ89	HA-C1493T	5/P/gaattttatcacaaatgtgatgatgaatg (SEQ ID NO: 41)
	HJ90	HA-C1493T.as	cattcatcatcacatttgtgataaaattc (SEQ ID NO: 42)
	HJ91	NP-C113A	5/P/gccagaatgcaactgaaatcagagc (SEQ ID NO: 43)
NP	HJ92	NP-C113A.as	gctctgatttcagtttcattctggc (SEQ ID NO: 44)
	HJ93	NP-T1008C	5/P/ccgaatgagaatccagcacacaag (SEQ ID NO: 45)
	HJ94	NP-T1008C.as	cttgtgtgctggattctcattcgg (SEQ ID NO: 46)
	HJ95	NA-C1422T	catcaatttcatgcctatataagctttc (SEQ ID NO: 47)
NS	HJ96	NA-C1422T.as	gaaagcttatataggcatgaaattgatg (SEQ ID NO: 48)
	HJ97	NS-C38T	cataatggatcctaacactgtgtcaagc (SEQ ID NO: 49)
	HJ98	NS-C38T.as	gcttgacacagtgttaggatccattatg (SEQ ID NO: 50)
PA	HJ99	PA6C375T	ggagaatagattcatcgagattggag (SEQ ID NO: 51)
	HJ100	PA6C375T.as	ctccaatctcgatgaatctattctcc (SEQ ID NO: 52)

EJEMPLO 3: GENERACIÓN DE VIRUS INFLUENZA REORDENANTE Y MDV-A RECOMBINANTE INFECCIOSO

Se mantuvieron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células COS7 humanas en medio de Eagle modificado (MEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%. Se mantuvieron células renales embrionarias humanas (293T) en Opti-MEM I (Life Technologies) que contenía FBS al 5%. Se cocultivaron MDCK y o bien células COS7 o bien células 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 del virus influenza. El cocultivo con células MDCK garantiza la replicación eficaz de los virus recombinantes. Antes de la transfección, se sustituyeron los 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 cocultivadas. Se incubaron las células transfectadas a 35ºC o 33ºC durante entre 6 horas y 24 horas, por ejemplo, durante la noche, y se sustituyó la mezcla de transfección por 1 ml de Opti-MEM I en cada pocillo. Tras la incubación a 35ºC o 33ºC durante 24 horas, se añadió 1 ml de Opti-MEM I que contenían TPCK-tripsina 1 µg/ml a cada pocillo y se incubaron durante 12 horas adicionales. Entonces se amplificó el virus recuperado en células MDCK confluentes o se amplificó directamente en huevos de pollo embrionadas. Se infectaron las células MDCK en una placa 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 sustituyó por 2 ml de Opti-MEM I que contenía TPCK-tripsina 1 µg/ml. Se incubaron las células a 35ºC o 33ºC durante 3-4 días. Se almacenaron los virus amplificados a -80ºC en presencia del estabilizador SPG o se purificaron en placa y se amplificaron en células MDCK o huevos embrionados de pollo.

Expresión funcional de proteínas polimerasa de MDV-A

Se analizó la actividad funcional de las cuatro proteínas polimerasa de MDV-A, PB2, PB1, PA y NP, por 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 ADNc de la cepa A/PR/8/34 (H1N1) y un minigenoma de virus influenza que contenía un gen indicador que codifica para la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP, pHW72-EGFP).

Se transfectaron PB1, PB2, PA y NP o PB1, PA, NP (-PB2 como control negativo) de MDV-A en las células MDCK/293T cocultivadas junto con un plásmido que representa 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 al microscopio de contraste de fases o microscopio de fluorescencia a las 48 horas tras la transfección. Alternativamente, puede emplearse citometría de flujo para detectar la expresión de EGFP.

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

En otros ensayos, se utiliza un minigenoma que incluye el gen de cloramfenicol acetil transferasa (CAT), designado pFlu-CAT para medir la actividad polimerasa. En un ensayo de este tipo, se mide la expresión de CAT al nivel de

proteína (por ejemplo, mediante ELISA) o de ARN, como indicador de la replicación del minigenoma.

Análisis de los plásmidos de MDV-A mediante un experimento reordenante de genes individuales

Se mostró que cada uno de los 8 segmentos genómicos de MDV-A clonados en pAD3000 se expresaba funcionalmente en un experimento reordenante mediante la cotransfección de un segmento génico individual de MDA-A junto con los siete segmentos complementarios de la cepa control A/PR/8/34. Los ocho plásmidos de segmento genómico individual en combinación con los segmentos control complementarios generaron virus reordenantes infecciosos, que provocaban efectos citopáticos en células MDCK infectadas, lo que indica que los ocho plásmidos codifican para proteínas de MDV-A funcionales. Tabla 4.

Tabla 4. Recuperación de reordenantes 7+1 mediante plásmidos

Segmento génico de virus	PB2	PB1	PA	NP
1	**PMDV-A-PB2**	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	PHW192-PB1	**pMDV-A-PB1**	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	PHW193-PA	pHW 193-PA	**pMDV-A-PA**	pHW193-PA
4	PHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	**pMDV-A-NP**
5	PHW197-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	PHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	PHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA
8	PHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)
Segmento génico 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	**PMDV-A-M**	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	PHW198-NS	**pMDV-A-NS**	pHW198-NS	pHW198-NS
7	PHW194-HA	pHW194-HA	**pMDV-A-HA**	pHW194-HA
8	PHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	**pMDV-A-NA**
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)

Para determinar adicionalmente las limitaciones de empaquetamiento del virus influenza A, se separó el segmento NS en dos segmentos génicos separados: uno que codifica para el segmento genómico NS1 y otro que codifica para el segmento genómico NS2. Se transfectaron los nueve plásmidos que incorporan los segmentos genómicos de influenza A en células MDCK/COS tal como se describió anteriormente, y se amplificaron los virus recuperados en huevos de pollo embrionados antes de la titulación en células MDCK. Se observó un tamaño de placa 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 estaba presente el segmento NS2 en los viriones, y que el segmento génico NS1 no estaba empaquetado.

Recuperación de virus MDV-A y reordenantes 6:2

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, tres días tras la transfección con cualquiera de los 8 plásmidos de MDV-A (recombinantes), o con los plásmidos que incorporan los 6 genes internos de MDV-A, y HA y NA derivados de A/PR/8/34 (reordenante 6:2), se usaron los sobrenadantes de cultivos transfectados para infectar células MDCK nuevas y se incubaron las células infectadas a 33ºC durante tres días en presencia de TPCK-tripsina 1 µg/ml. Se observó el efecto citoplasmático del virus recombinante sobre las células MDCK infectadas usando un microscopio. Se monitorizó la expresión de la hemaglutinina viral usando un ensayo de hemaglutinación (HA) convencional. Se realizaron ensayos de HA mezclando 50 µl de sobrenadantes de cultivo diluidos dos veces en serie con 50 µl de glóbulos rogos de pollo al 1% en placas de 96 pocillos. Se detectó un título de HA de aproximadamente 1:254-1:1024 para los virus amplificados derivados de o bien los 8 plásmidos de MDV-A transfectados, o bien el 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, MDV-A y reordenante 6:2

Segmento génico de virus	A/PR/8/34 (H1N1)	rMDV-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)	pHW 196-NA (AD736)
CPE	+	+	+

Se realizó RT-PCR para mapear los genotipos de los virus recuperados. Se aisló el ARN viral del sobrenadante de cultivos celulares infectados usando el kit RNeasy mini (Qiagen) y se amplificaron los ocho segmentos de virus influenza mediante RT-PCR usando cebadores específicos para cada segmento génico de MDV-A y cebadores específicos para H1 y N1. Tal como se muestra en la figura 3, rMDV-A contenía PB2, PB 1, NP, PA, M y NS que eran específicos para MDV-A y HA y NA específicos para el subtipo H2 y N2. El reordenante 6:2 contenía los 6 genes internos derivados de MDV-A, y HA y NA derivados de A/PR/8/34 (H1N1). Esto confirmó que los virus generados a partir de los plásmidos transfectados tenían los genotipos correctos.

Se titularon los virus rescatados mediante ensayo de placas en células MDCK y se confirmó que las placas eran virus influenza mediante inmunotinción usando suero de pollo generado contra MDV-A. Se infectaron células MDCK a una confluencia del 100% en placas de 12 pocillos con 100 µl de virus diluidos en serie 10 veces a TA durante 1 hora con sacudidas suaves. Se retiró el inóculo y se recubrieron las células con 1X L15 que contenía agarosa al 0,8% y TPCK-tripsina1 µg/ml. Se incubaron las placas a 35ºC o 33ºC durante tres días, se fijaron con metanol al 100%, se bloquearon mediante leche al 5% en PBS y se incubaron con antisuero de pollo anti-MDV-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 mediante la adición de la disolución de sustrato de HRP (DAKO). Todos los virus recuperados presentaron inmunotinción positiva.

EJEMPLO 4: MAPEO DE LA BASE GENÉTICA DE LOS FENOTIPOS CA, TS, ATT DE MDV-A

La cepa de la vacuna de virus influenza MDV-A tiene varios fenotipos relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, vacunas atenuadas vivas: adaptación al frío (ca), sensibilidad a la temperatura (ts) y atenuación (att). La comparación de secuencias de la cepa MDV-A con la cepa A/AA/6/60 de tipo natural virulenta no ts reveló un mínimo de 17 diferencias entre estas dos cepas (tabla 6). Varios de los cambios en la secuencia de MDV-A son únicos para esta cepa en comparación con todos los virus influenza de tipo A disponibles en la base de datos GeneBank, lo que sugiere que una o más de estas sustituciones de aminoácido está relacionada funcionalmente con el/los fenotipo(s) att, ca y ts. El cambio de aminoácido individual en $PB2^{821}$ fue la única posición de nucleótido que se había notificado anteriormente como determinante en el fenotipo ts de MDV-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 identificar las sustituciones mínimas implicadas en los fenotipos de MDV-A, se cambiaron individualmente los nucleótidos en el clon de MDV-A que diferían de A/AA/6/60 de tipo natural por los de A/AA/6/60 de tipo natural (es decir, "se revertieron"). Entonces se introdujo cada segmento génico revertido en células huésped en combinación con segmentos complementarios de MDV-A para recuperar los reordenantes génicos individuales. Además, el segmento génico revertido y el segmento de MDV-A correspondiente también pueden transfectarse en combinación con segmentos derivados de otras cepas de tipo natural, por ejemplo, la cepa A/PR/8/34, para evaluar la contribución de cada segmento génico a los fenotipos del virus. Usando el sistema de plásmidos de MDV-A recombinante descrito anteriormente, se realizó mutagénesis dirigida al sitio para modificar adicionalmente los seis genes internos para producir un reordenante no ts. Se introdujeron un total de 15 mutaciones de sustitución de nucleótidos en los seis plásmidos de MDV-A para representar el genoma de A/AA/6/60 de tipo natural recombinante (rWt, Flu064) tal como se enumera en la tabla 6. Se mantuvieron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células COS-7 y se transfectaron tal como se describió anteriormente. Entonces se realizaron pases del virus recuperado en células MDCK una vez, seguido por amplificación en las cavidades alantoideas de huevos de pollo embrionados. Se realizó la transfección y el crecimiento de virus en MDCK y huevos a 33ºC, una temperatura permisiva para virus tanto ca como de tipo natural para minimizar cualquier presión de selección de 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 secuencia de A/AA/6/60 "de tipo natural" y MDV-A

Segmento de ARN	Posición de base (aminoácido)	E10SE2	MDV-A	Tipo natural recombinante (Flu044)

PB2	**141**	A	G	A
	821 (265)	A (Asn)	G(Ser)	A
	1182	A	T	T
	1212	C	T	T
	1933	T	C	T
PB1	123	A	G	G
	1195 (391)	A (Lys)	G (Glu)	A
	1395 (457)	G (Glu)	T (Asp)	G
	1766 (581)	A (Glu)	G (Gly)	A
	2005 (661)	G (Ala)	A (Thr)	A
	2019	C	T	C
PA	**20**	T	C	T
	1861 (613)	A (Lys)	G (Glu)	G
	2167/8 (715)	TT (Leu)	CC (Pro)	TT
NP	**146 (34)**	A (Asp)	G (Gly)	G
	1550	'5A'	'6A'	'6A'
M	**969 (M2-86)**	G (Ala)	T (Ser)	G
NS	**483 (NS1-153)**	G (Ala)	A (Thr)	G
Los números en negrita representan las diferencias entre rMDV-A y tipo natural recombinante. Los términos en negrita (15) son los cambios entre rmdv-a y tipo natural recombinante.				

Se determinaron las 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 trayptophan mutants of influenza". En resumen, se determinó la sensibilidad a la temperatura de los virus recombinantes mediante ensayo de placas en células MDCK a 33, 38 y 39ºC. 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 agarosa al 1% y TPCK-tripsina 1 µg/ml. Se incubaron las células infectadas a 33ºC en un incubador de CO_2 o en recipientes estancos al agua que contenían un 5% de CO_2 sumergidos en baños de agua circulante mantenidos a 38 ± 0,1ºC o 39 ± 0,1ºC (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 inmunotiñeron las monocapas usando anticuerpos policlonales de pollo anti-MDV y se enumeraron las placas. Se compararon los recuentos de placas obtenidos a cada una de las temperaturas para evaluar el fenotipo ts de cada virus y se realizó cada ensayo un mínimo de tres veces. Se definió la temperatura de desactivación como la temperatura más baja que tenía una reducción de título de 100 veces o mayor en comparación con 33ºC.

Se amplificó el virus infeccioso obtenido a partir de células COS-7/MDCK cocultivadas transfectadas con los ocho plásmidos (pMDV-PB2, pMDV-PB1, pMDV-PA, pMDV-NP, pMDV-HA, pMDV-NA, pMDV-M y pMDV-NS) en huevos embrionados de pollo y se mostró que presentaban el fenotipo ts característico de MDV-A derivado biológico, no recombinante (tabla 7). Ni MDV-A ni rMDV-A formaron placas distintas a 39ºC, aunque ambos formaron placas visualizadas fácilmente a 33ºC.

Tabla 7. Replicación de reordenantes de MDV/tipo natural a diversas temperaturas

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

Con el fin de de realizar un análisis sistemático, detallado de la base genética del fenotipo ts de MDV-A, se utilizaron las secuencias de varias cepas A/AA/6/60 de tipo natural, no ts, no att, estrechamente relacionadas con 17-48 diferencias de nt con respecto a A/AA/6/60 ca, incluyendo el aislado altamente relacionado, A/AA/6/60 E10SE2 de tipo natural, para comparación. Existe un total de 19 diferencias de nt entre E10SE2 y MDV-A (tabla 6). Se mostró

que E10SE2 era no ts (tabla 7) y no att en hurones. Con el fin de generar un virus no ts recombinante, se alteraron los plásmidos de MDV-A mediante mutagénesis dirigida al sitio para que incorporaran 15 de las 19 diferencias que representan 10 cambios de aminoácidos. Cuatro de las posiciones de nucleótido, PB2-1182, 1212, PB1-123 y NP-1550, que diferían entre MDV-A y E10SE2 no se alteraron con respecto a la secuencia de MDV-A, puesto que estos nucleótidos se observaron en otros aislados no ts de A/AA/6/60 y, por tanto, no se esperaba que tuviesen 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 atenuattion. Virus Research 42:11-25). Se obtuvieron virus recombinantes (tipo natural recombinante, Flu064), que codificaban para los 15 cambios de nucleótido, a partir de las células COS-7/MDCK cocultivadas 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 el tipo natural recombinante contenía los cambios genéticos diseñados y era no ts a 39ºC, de manera idéntica a A/AA/6/60 de tipo natural derivado biológicamente. 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 del virus

Se evaluó el efecto de cada segmento génico de tipo natural sobre el fenotipo ts de MDV-A creando reordenantes génicos individual, recombinantes (tabla 7). La introducción de PB2 de tipo natural en rMDV-A dio como resultado un virus que solo era no ts a 38ºC; sin embargo, permanecía ts a 39ºC. La reducción en el título de virus a 38ºC y 39ºC (en relación con 33ºC) fue de 0,6 $\log_{10}$ y 2,7 $\log_{10}$, respectivamente, tal como se mide mediante ensayo de placas en células MDCK. El reordenante que contenía el segmento génico PB1 de tipo natural era no ts, con respecto a su capacidad para formar placas tanto a 38 como a 39ºC. Sin embargo, el tamaño de placa de este recombinante estaba influido por el aumento de la temperatura y se redujo significativamente a 39ºC en comparación con el tipo natural recombinante. La introducción del segmento génico NP de tipo natural en rMDV-A dio como resultado un virus que también era no ts a 38ºC, pero a diferencia del recombinante de PB2 de tipo natural, el virus que contenía el segmento génico NP de tipo natural no formó placas a 39ºC. La introducción de los segmentos génicos PA, M o NS de tipo natural independientemente en rMDV-A no alteró el fenotipo ts, lo que indica que estos tres segmentos génicos tenían un papel mínimo en el mantenimiento de este fenotipo.

Puesto que ni PB1 de tipo natural, ni PB2 de tipo natural ni NP de tipo natural expresados individualmente en el antecedente de MDV-A podían crear un perfil de eficacia de placas y tamaño de placa idéntico al tipo natural recombinante no ts, se introdujeron estos segmentos génicos en MDV-A en diversas combinaciones. La combinación de PB1 de tipo natural y PB2 de tipo natural dio como resultado un virus que no era ts ni a 38 ni a 39ºC (tabla 7). Aunque el tamaño de placa era mayor que el de cualquier reordenante génico individual, era significativamente más pequeño que en el tipo natural recombinante. La combinación triple de PB1/PB2/NP de tipo natural en rMDV-A dio como resultado un virus que era similar o idéntico al tipo natural recombinante en su eficacia de formación de placas y en el tamaño de placa a 39ºC. Por tanto, mientras que los segmentos génicos PB2, PB1 y NP de tipo natural solo revertían parcialmente el fenotipo ts cuando se introducían individualmente, la combinación de los tres segmentos génicos de tipo natural podía revertir completamente el fenotipo ts a un comportamiento no ts idéntico al tipo natural recombinante.

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

Mapeo de los loci genéticos que determinaban el fenotipo ts de MDV-A.

Se abordaron las diferencias específicas entre los segmentos génicos PB1, PB2 y NP del tipo natural recombinante y rMDV-A de manera sistemática para identificar aquellos cambios que desempeñaban un papel significativo en el fenotipo ts. El gen de NP de rMDV-A difería de NP de tipo natural recombinante sólo en el nt 146 (G34D, tabla 6). El gen de PB2 de rMDV-A difería del tipo natural recombinante en tres sitios, pero sólo el nt 821 dio como resultado un cambio de aminoácido (N265S, tabla 6) y presumiblemente representaba el locus ts ubicado en el segmento génico PB2. El gen de PB1 de MDV-A difería de PB1 de tipo natural en 6 posiciones de nt, de las que 4 eran cambios de codificación (tabla 6). Se sustituyó individualmente cada una de las sustituciones de residuo de aminoácido de tipo natural en el segmento génico PB1 de rMDV-A para evaluar su papel en el fenotipo ts. 1395G (Glu-457) y 2005G (Ala) no afectaron al fenotipo ts de MDV-A. 1195A (Lys-391) y 1766A (Glu-581) dieron cada uno como resultado una ligera reducción en el fenotipo ts a 38ºC, pero no tuvieron efecto a 39ºC (tabla 8). Estos datos indicaron que 1195A y 1766A eran los loci de ts probables en el segmento génico PB1. Sin embargo, la combinación de tanto 1195A como

1766A no produjo un fenotipo ts similar a PB1 de tipo natural (tabla 6). La adición de 2005G pero no de 1395A a PB1-1195A/1766A disminuyó adicionalmente el fenotipo ts del virus a 39ºC, lo que demuestra que 2005A también desempeñaba un papel en la expresión del fenotipo ts especificado por el segmento PB1 de MDV-A.

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

Virus con secuencia de tipo natural	33ºC	38ºC	33ºC/38ºC log_{10} UFP/ml	39ºC	33ºC/ 39ºC
rMDV-A	8,67	6,00	2,67	<4,0†	>4,67
Tipo natural recombinante	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
PBl-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 en el tamaño de placa en comparación con el tipo natural recombinante.
† El subrayado indica que no se detectaron placas a una dilución de 10^{-4} veces

Entonces se introdujeron mutaciones de sitio único de PB1 junto con PB2 de tipo natural y NP de tipo natural en rMDV-A. El reordenante PB2/NP de tipo natural y MDV-A y era no ts a 38ºC y tenía una reducción de título de 1,25 log_{10} a 39ºC pero su tamaño de placa se redujo mucho en comparación con el tipo natural. La adición de o bien PB1-1195A o bien 1766A no cambió significativamente el fenotipo del reordenante PB2/NP de tipo natural. Sólo la combinación de PB1-1195A y 1766A, junto con un PB2 de tipo natural y NP de tipo natural, dio como resultado un virus que tenía el mismo fenotipo no ts que el reordenante PB1/PB2/NP de tipo natural y rMDV-A (tabla 8). La adición de PB1-1395G o 2005G a PB1-1766/PB2/NP de tipo natural no convirtió el virus a un fenotipo no ts característico del tipo natural recombinante. Estos datos demuestran, por tanto, que los cuatro aminoácidos distribuidos en los tres genes de PB1, PB2 y NP podían revertir completamente el fenotipo ts de MDV-A.

Restricción de células huésped de virus MDV-A y reordenantes

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

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

Para determinar si los cinco aminoácidos identificados en los segmentos génicos PB1, PB2 y NP de MDV-A reproducirían los fenotipos ts y att de MDV-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_{10} en el título de virus a 38ºC y una reducción de 4,6 log_{10} a 39ºC, que era muy similar a la de rMDV-A (figura 11).

La comparación de secuencias entre los genes de PB1, PB2 y NP de A/AA/6/60 ca (MDV-A) y A/PR/8/34 reveló que los cuatro aminoácidos sustituidos identificados en los genes de PB1 y PB2 de MDV-A son únicos. NP^{34} está conservado entre MDV-A y PR8. Por tanto, se introdujeron los tres sitios ts, $PB1^{391}$ (K391E), $PB1^{581}$ (E581G) y $PB1^{661}$ (A66 1T), identificados en el gen de PB1 de MDV-A en PB1 de A/PR/8/34 y se introdujo $PB2^{265}$ (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 enumeran en la tabla 9. Estos virus se muestran esquemáticamente en la figura 16.

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

HJ240	PR8-PB1A1195G	5’ GAAAGAAGATTGAAGAAATCCGACCGCTC (SEQ ID NO: 79)
HJ241	PR8-PB1A1195G.as	5’ GAGCGGTCGGATTTCTTCAATCTTCTTTC (SEQ ID NO: 80)

HJ242	PR8-PB1A1766G	5’ GAAATAAAGAAACTGTGGGGGCAAACCCGTTCC (SEQ ID NO: 81)
HJ243	PR8-PB1A1766G.as	5’ GGAACGGGTTTGCCCCCACAGTTTCTTTATTTC (SEQ ID NO: 82)
HJ244	PR8-PB1G2005A	5’ GTATGATGCTGTTACAACAACACACTC C (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, designado pFlu-CAT, contenía el gen de CAT de sentido negativo clonado bajo el control del promotor pol I. La expresión de la proteína CAT dependía de la expresión de las proteínas PB1, PB2, PA y NP de influenza.

Brevemente, se transfectaron células HEp-2 con 1 µg de cada uno de PB1, PB2, PA, NP y minigenoma pFlu-CAT mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Tras la incubación durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 33ºC o 39ºC, se analizaron los extractos de células para determinar la expresión de la proteína CAT mediante el kit de ELISA de CAT (Roche Bioscience). Se midió el nivel de ARNm de CAT mediante un ensayo de extensión con cebador. A las 48 h tras la transfección, se extrajo el ARN celular total mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se mezcló 1/3 del ARN con un exceso de cebador de ADN (5’-ATGTTCTTTACGATGCGATTGGG) marcado en su extremo 5’ con [r-^{32}P]-ATP y polinucleótido cinasa de T4 en 6 ul de agua. Tras la desnaturalización a 95ºC durante 3 min, se realizó la extensión con cebador tras la adición de 50 U de transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen) en el tampón de reacción facilitado con la enzima que contenía dNTP 0,5 mM durante 1 h a 42ºC. Se analizaron los productos de la transcripción en geles de poliacrilamida al 6% que contenían urea 8 M en tampón TBE y se detectaron mediante autorradiografía.

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

Se generaron virus mutantes PR8 y se recuperaron tal como se describió anteriormente. En resumen, se transfectaron células cos7 y MDCK cocultivadas con ocho plásmidos que codificaban para los genes de PR8 HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M y NS derivados de PR8. Para obtener un virus que portara cuatro loci ts (PR8-4s), se usaron PB1-3s que contenían tres cambios en PB1 en las posiciones nt 1195 (K391E), nt 1766 (E581G) y nt 2005 (A661T) y PB1-1s que contenía un cambio en PB2 en la posición 821 (N265S). Además, también se recuperó por separado un virus PR8 que portaba 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 virus PR8 mutantes recombinantes crecieron con un título muy alto en huevos embrionados, alcanzando un título de 9,0 log10 ufp/ml o mayor tal como se muestra en la tabla 10.

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 ^{35}S-Trans a las 7 h tras la infección durante 1 h. Se sometió a electroporación el lisado celular marcado sobre gel de poliacrilamida al 1,5% que contenía SDS y se sometió a autorradiografía. También se estudió la síntesis de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se recogieron células infectadas con virus a las 8 h tras la infección y se sometieron a electroforesis en un gel en gradiente del 4-15%. Se estudió con sonda la transferencia con anticuerpo anti-M1 o anticuerpo policlonal de pollo anti-MDV-A, seguido por incubación con anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se detectaron las bandas de proteína conjugada con anticuerpo mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia (Invitrogen) seguido por exposición a película de rayos X.

Tal como se muestra en la figura 19, todas tenían un nivel similar de síntesis de proteínas a 33ºC, sin embargo, a 39ºC el nivel de síntesis de proteínas se redujo ligeramente para PR8-1s pero se redujo enormemente en células infectadas con PR8-3s y PR8-4s. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western también mostró que la síntesis de proteínas se reducía 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 las temperaturas no permisivas.

Se determinó la sensibilidad a la temperatura de los virus mutantes PR8 mediante ensayo de placas en células MDCK a 33ºC, 37ºC, 38ºC y 39ºC. Se amplificaron los virus recuperados en huevos embrionados y se introdujeron en células tal como se describió anteriormente. Tras la incubación de células infectadas con virus durante tres días a las temperaturas designadas, se inmunotiñeron las monocapas celulares usando anticuerpos monoclonales de pollo anti-MDV y se enumeraron las placas. Se compararon los recuentos de placas obtenidos en cada una de las

temperaturas para evaluar el fenotipo ts de cada virus. Se definió la temperatura de desactivación como la temperatura más baja que tenía una reducción de título de 100 veces o mayor en comparación con 33ºC.

Tal como se muestra en la tabla 10 y en la figura 17, todos los mutantes se replicaban bien a 33ºC aunque se observó una ligera reducción en el título de virus. A 38ºC, se observó una reducción significativa en el título de virus para todos los mutantes. A 39ºC, se observó una reducción en el título de virus mayor de 4,0 log_{10} para los virus que portaban los tres loci de ts en el gen de PB1 (PR8-3s y PR8-4s). PR8-1s era también ts a 39ºC. El fenotipo ts de PR8-4s era muy similar al de MDV-A que tenía una reducción de 4,6 log_{10} a 39ºC en comparación con 33ºC. Aunque los tres mutantes PR8 no tenían una reducción mayor de 2,0 log_{10} en el título de virus a 37ºC, su morfología de placas era diferente de la de a 33ºC. Tal como se muestra en la figura 18, el tamaño de placa para cada mutante se redujo sólo ligeramente a 33ºC en comparación con PR8. Se observó una reducción significativa en el tamaño de placa a 37ºC para PR8-3s y mayor para PR8-4s. PR8-1s no tenía una reducción significativa en el tamaño de placa a 37ºC. A 39ºC, sólo se observaron unas cuantas placas de tamaño puntiforme para tanto PR8-3s como PR8-4s. Se observó un tamaño de placa de aproximadamente el 30% del de PR8 de tipo natural para PR8-1s.

Tabla 10. Sensibilidad a la temperatura de PR8 con el título de virus con loci de ts introducidos (log_{10} ufp/ml)

Virus	33ºC	37ºC	38ºC	39ºC
MDV-A	8,6	7,0	6,4	4*
A/AA de tipo natural	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 virus a 10.000 diluciones.

Se examinó la atenuación de los virus PR8 mutantes en hurones. En resumen, se usaron hurones macho de 9-10 semanas de edad para evaluar la replicación de virus en el tracto respiratorio de un huésped animal. Se alojaron los hurones individualmente y se les inoculó por vía intranasal 8,5 log_{10} ufp de virus. Tres días tras la infección, se sedaron los hurones con ketamina-HCl, se recogieron los pulmones y los cornetes nasales (NT). Se diluyeron en serie los homogeneizados de tejido pulmonar y se titularon en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Se calculó el título de virus (log_{10} EID_{50}/ml) en pulmones mediante los métodos de Karber. Se determinó la replicación del virus en NT mediante ensayo de placas y se expresó como log_{10} ufp/ml.

Se midieron los niveles de replicación del virus en pulmones y cornetes nasales mediante ensayos de placas o EID50 (tabla 11). Tres días tras la infección, PR8 se replicaba a un nivel de 5,9 log_{10} Em50/gramo de tejido pulmonar. Sin embargo, PR8-1s presentaba una reducción de 3,0 log_{10} en la replicación de 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 el ensayo de EID50 es de 1,5 log_{10} y por tanto se asignó un título de 1,5 log_{10} EID50 para PR8-4s. Como control, MDV-A no se replicaba en pulmones de hurón y A/AA/6/60 de tipo natural se replicaba a un título de 4,4 log_{10}. Se examinó la replicación del virus en cornetes nasales (NT) mediante ensayo de placas en células MDCK. PR8 se repicaba a un título de 6,6 log_{10} ufp/g en la nariz. Sólo se observaron ligeras reducciones en el título de virus para PR8-1s y PR8-3s. Se observó una reducción de 2,2 log_{10} para PR8-4s (A), mientras que se observó una reducción de 4,3 log_{10} para PR8-4s (B), que portaba un cambio en el gen de PB1 (E390G). La replicación enormemente reducida de PR8-4s (B) se correlaciona bien con su fenotipo ts a 37ºC. Se usó una dosis infecciosa de 8,5 log10 ufp en este caso en lugar de 7,0 log10 ufp que se usaba habitualmente para evaluar el fenotipo de atenuación de vacunas contra la gripe derivadas de MDV-A. Este resultado indicó que PR8 que porta los cuatro loci de ts derivado de MDV-A tenía una replicación atenuada en el tracto respiratorio inferior de hurones.

Tabla 11. Replicación de mutantes PR8 en hurones

Virus	Hurones	Dosis (log_{10} ufp)	Título de virus en pulmones (log_{10} EID50/g ± EE)	Título de virus en cornetes nasales (log_{10}/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[a]	4,6 ± 0,2
PR8-4s (B)[b]	4	8,5	1,5 ± 0,0	2,3 ± 0,3

MDV-A	4	8,5	1,5 ± 0,0	4,6 ± 0,1
A/AA tn	4	8,5	4,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1
a) No se detectó virus y se asignó un título de 1,5 $\log_{10}$ EID50/g b) El virus contiene un cambio adicional en PB1-1193 (E390G)				

En los ensayos de tanto ts como att, el virus mutante PR8 presentaba fenotipos tanto ts como att que eran muy similares a los de MDV-A. Estos datos indican que la introducción de las sustituciones de aminoácido únicas del MDV-A en una cepa de virus influenza divergente da como resultado un virus que presenta los fenotipos sensible a la temperatura y atenuado deseables para producir, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas. Adicionalmente, el virus PR-8 ts, att crecía a un alto título que era adecuado para su uso como virus donador maestro para la producción de vacunas contra la gripe vivas atenuadas o inactivadas. Estos resultados indican que las cinco mutaciones de MDV-A: PB1-391E, PB1-581G, PB1-661T, PB2-265S y NP-34G pueden conferir los fenotipos ts y att a cualquiera 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 MDV-B en virus de la cepa de influenza B. Además de producir vacunas de virus atenuados vivos, 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 MDV-B

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 (MDV-B) a partir de 100 µl de líquido alantoideo de huevos embrionados infectados usando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), y se eluyó el ARN en 40 µl de H_2O. Se realizó RT-PCR de segmentos genómicos usando el kit de RT-PCR One Step (Qiagen, Valencia, CA) según el protocolo proporcionado, usando 1 µl del ARN extraído para cada reacción. La reacción de RT se realizó durante 50 min a 50ºC, seguido por 15 min a 94ºC. La PCR se realizó durante 25 ciclos a 94ºC durante 1 min, 54ºC durante 1 min y 72ºC durante 3 min. Se amplificaron los genes de P usando cebadores específicos de segmento con sitios *Bsm*BI 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 influenza B/Ann Arbor/1/66 ca.

	Cebador directo	**Cebador inverso**
PB1	**Bm-PB1b-1:** (SEQ ID NO: 53)	**Bm-PB1b-1200R:** (SEQ ID NO: 54)
[1A]	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATG**	TATTCGTCTC**GATGCCGTTCCTTCTTCATTGAAGAATGG**
PB1	**Bm-PB1b-1220:** (SEQ ID NO: 55)	**Bm-PB1b-2369R:** (SEQ ID NO: 56)
[1B]	TATTCGTCTCG**GCATCTTTGTCGCCTGGGATGATGATG**	ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACACGAGCCTT**
PB2	**Bm-PB2b-1:** (SEQ ID NO: 57)	**Bm-PB2b-1145R:** (SEQ ID NO: 58)
[2A]	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAGATG**	TATTCGTCTC**TCTCATTTTGCTCTTTTTTAATATTCCCC**
PB2	**Bm-PB2b-1142:** (SEQ ID NO: 59)	**Bm-PB2b-2396R:** (SEQ ID NO: 60)
[2B]	TATTCGTCTCATG**AGAATGGAAAAACTACTAA**T**AAATTCAGC**	ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACACGAGCATT**
PA	**Bm-Pab-1:** (SEQ ID NO: 61)	**Bm-PAb-1261R:** (SEQ ID NO: 62)
[3A]	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCGGTGCGTTTGA**	TATTCGTCTCCC**AGGGCCCTTTTACTTGTCAGAGTGC**
PA	**Bm-Pab-1283:** (SEQ ID NO: 63)	**Bm-PAb-2308R:** (SEQ ID NO: 64)
[3B]	TATTCGTCTCT**CCTGGATCTACCAGAAATAGGGCCAGAC**	ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACACGTGCATT**
HA	**MDV-B 5'BsmBI-HA:** (SEQ ID NO: 65)	**MDV-B 3'BsmBI-HA:** (SEQ ID NO: 66)
	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATC**	ATATCGTCTCGTATT**AGTAGTAACAAGAGCATTTTTC**
NP	**Ba-NPb-1:** (SEQ ID NO: 67)	**Ba-NPb-1842R:** (SEQ ID NO: 68)
	TATTGGTCTCAGGG**AGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGT**	ATATGGTCTCGTATT**AGTAGAAACAACAGCATTTTT**
NA	**MDV-B 5'BsmBI-NA:** (SEQ ID NO: 69)	**MDV-B 3'BsmBI-NA:** (SEQ ID NO: 70)
	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCAAAAC**	ATATCGTCTCGTATTAGT**AGTAACAAGAGCATTTTTCAG**
M	**MDV-B 5'BsmBI-M:** (SEQ ID NO: 71)	**MDV-B 3'BsmBI-M:** (SEQ ID NO: 72)
	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCACGCACTTTCTTAAAATG**	ATATCGTCTCGTATT**AGTAGAAACAACGCACTTTTTCCAG**
NS	**MDV-B 5'BsmBI-NS:** (SEQ ID NO: 73)	**MDV-B 3'BsmBI-NS:** (SEQ ID NO: 74)
	TATTCGTCTCAGGG**AGCAGAAGCAGAGGATTTGTTTAGTC**	ATATCGTCTCGTATT**AGTAGTAACAAGAGGATTTTTAT**

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

Clonación de plásmidos

Se aislaron fragmentos de PCR, se digirieron con *Bsm*BI (o *Bsa*I 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 *Bsm*BI 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 MDV-B basándose en la secuenciación de los fragmentos de RT-PCR directamente. Los plásmidos que tenían sustituciones de nucleótido que dieron como resultado cambios de aminoácidos diferentes de la secuencia consenso se "repararon" o bien clonando los plásmidos o bien utilizando el kit Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA). Los plásmidos de B/Ann Arbor/1/66 resultantes se designaron pAB121-PB1, pAB122-PB2, pAB123-PA, pAB124-HA, pAB125-NP, pAB126-NA, pAB127-M y pAB128-NS. Usando este sistema de transcripción bidireccional, se produjeron intracelularmente todos los ARN y las proteínas virales, dando como resultado la generación de virus influenza B infecciosos (figura 4).

Resulta significativo 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 dieron como resultado alteraciones de aminoácidos y no se prevé que afecten al rescate y al crecimiento virales. 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 (MDV-B)

Seg.	**plásmidos**	**nucleótidos**	**proteína**
PB1	PAB121-PB1	A924>G924; C1701>T1701	silenciosa
PB2	PAB122-PB2	consenso	---
PA	PAB123-PA	consenso	---
HA	PAB124-HA	T150>C150; T153>C153	silenciosa
NP	PAB125-NP	consenso	---
NA	PAB126-NA	consenso	---
M	PAB127-M	consenso	---
NS	PAB128-NS	A416>G416	NS 1: silenciosa

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 los 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 *Bsm*BI y se insertaron en pAD3000-B*sm*BI en a una reacción de ligamiento de tres fragmentos. Se secuenciaron los plásmidos generados para garantizar que el ADNc no contenía mutaciones no deseadas.

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

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

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

Para superar los obstáculos que se encuentran en el intento de hacer crecer influenza B en un sistema de cultivo celular libre de virus auxiliar, la presente invención proporciona vectores y protocolos novedosos para la producción de virus influenza de la cepa B recombinante y reordenante. El sistema de vectores usado para el rescate del 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 virus influenza A from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113; Hoffmann y Webster (2000) Unidirectional RNA polimerase I-polimerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids J Gen Virol 81:2843-7). Se cocultivaron células 293T o COS-7 (células de primate con alta eficacia de transfección y actividad múltiple) con células MDCK (permisivas para virus influenza), las células 293T se mantuvieron en medio OptiMEM I-AB que contenía FBS al 5%, las células COS-7 se mantuvieron en medio DMEM I-AB que contenía FBS al 10%. Las células MDCK se mantuvieron en 1x MEM, FBS al 10% con la adición de agentes antibióticos y antimicóticos. Antes de la transfección con los vectores genómicos virales, 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 frasco de 75 cm^2 (las células MDCK se incubaron durante 20-45 min, las células 293T se incubaron 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 mezclaron. Entonces se añadieron alícuotas de las células a una placa de 6 pocillos a 3 ml/pocillo. Tras 6-24 horas, se mezcló 1 µg de cada plásmido en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con OptiMEM I-AB para los plásmidos (x µl de plásmidos + x µl de OptiMEM I-AB + x µl DE TransIT-LT1 = 200 µl); 2 µ de TransIT-LT1 por µg de ADN de plásmido. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 45 min. Entonces 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 33ºC 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 33ºC durante 24 horas. 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 retiró 1 ml del sobrenadante de cultivo celular y se monitorizó mediante ensayo de placas o HA. Brevemente, se añadió una alícuota de 1 ml de sobrenadante en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se transfirieron novecientos µl de sobrenadante a un tubo nuevo y se realizaron diluciones en serie a 500 µl/pocillo a células MDCK (por ejemplo, en placas de 12 pocillos). Se incubó el sobrenadante con las células durante 1 hora, luego se retiró y se sustituyó por medio de infección (1xMEM) que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina. Entonces se realizó ensayo de HA o ensayo de placas. Por ejemplo, para el ensayo de placas, se titularon los sobrenadantes en células MDCK que se incubaron con recubrimiento de agarosa al 0,8% durante tres días a 33ºC. Para la infección de huevos, se recogió el sobrenadante de células transfectadas seis o siete días tras la transfección, se inyectaron 100 µl de las diluciones de virus en Opti-MEM I en huevos de pollo embrionados de 11 días a 33ºC. Se determinó el título tres días tras la inoculación mediante el ensayo de $TCID_{50}$ en células MDCK.

Para generar MDV-B, se transfectaron o bien células 293T-MDCK o bien COS-7-MDCK cocultivadas con 1 µg de cada plásmido. Cuando se examinaron a de 5 a 7 días tras la transfección, las células MDCK cocultivadas mostraron efectos citopáticos (CPE), indicando la generación de virus MDV-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 en células MDCK y se determinó el título de virus mediante ensayo de placas. El título de virus del sobrenadante de 293T-MDCK cocultivadas fue de 5,0 x 10^6 ufp/ml y 7,6 x 10^6 ufp/ml en células COS7-MDCK.

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

segmento	1	2	3	4
PB1		---	PAB121-PB1	---
PB2	pAB121-PB1	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 cocultivadas, células COS-7-MDCK cocultivadas			
CPE	+	-	+	-
ufp/ml	5,0 x 10^6	0	7,6 x 10^6	0

Se transfectaron células 293T-MDCK cocultivadas (1, 2) o células COS7-MDCK cocultivadas (3, 4) de manera transitoria con siete u ocho plásmidos. Se monitorizó el efecto citopático (CPE) siete días tras la transfección en las células MDCK cocultivadas. Siete días tras la transfección, se titularon los sobrenadantes de las células transfectadas en 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 utilizando los vectores de plásmido de B/Yamanashi/166/98. Estos resultados muestran que el sistema de transfección permite la generación reproducible *de novo* de virus influenza B a partir de ocho plásmidos.

Genotipado de influenza B recombinante

Tras un pase posterior en células MDCK, se usó 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 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 B/Yamanashi/166/98, se recuperó el virus y se amplificó la región que engloba los nucleótidos 1280-1290 del segmento PA. La secuenciación confirmó que el virus recuperado correspondía al recombinante derivado de plásmido B/Yamanashi/166/98 (figuras 5C y D).

Fenotipado de rMDV-B

El virus MDV-B muestra dos fenotipos característicos: sensibilidad a la temperatura (ts) y adaptación al frío (ca). Por definición, una diferencia de 2 log (o superior) en el título de virus a 37ºC en comparación con 33ºC define ts, ca se define por una diferencia inferior a 2 log en el crecimiento del virus a 25ºC en comparación con 33ºC. Se infectaron células primarias de riñón de pollo (PCK) con el virus MDV-B original y con el virus transfectado derivado de plásmidos para determinar el crecimiento viral a tres temperaturas.

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

Se realizó el ensayo de fenotipo ca-ts mediante titulación de $TCID_{50}$ de las muestras de virus a 25, 33 y 37ºC. Este formato de ensayo mide el título de $TCID_{50}$ examinando el efecto citopático (CPE) del virus influenza sobre monocapas de células primarias de riñón de pollo en placas de cultivo celular de 96 pocillos a diferentes temperaturas (25ºC, 33ºC, 37ºC). Este ensayo no depende de la morfología de la placa, que varía con la temperatura y las cepas de virus; en cambio, depende únicamente de la capacidad del virus influenza para replicarse y producir CPE. Se suspendió una suspensión de células primarias de riñón de pollo (PCK), preparada mediante tripsinización del tejido primario, en medio MEM (de Earl) que contenía FCS al 5%. Se sembraron células PCK en placas de cultivo celular de 96 pocillos durante 48 horas con el fin de preparar una monocapa con una confluencia >90%. Tras 48 h, 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 prepararon diluciones en serie de diez veces de las muestras de virus en bloques de 96 pocillos que contenían PAM. Entonces se sembraron en placa las muestras de virus diluidas sobre la monocapa de PCK lavadas en las placas de 96 pocillos. En 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 control de células como repeticiones de 6 pocillos para cada muestra. Se tituló cada muestra de virus en 2-4 repeticiones. Se incluyó en cada ensayo el virus control de fenotipo con títulos determinados previamente a 25ºC, 33ºC y 37ºC. Con el fin de determinar el fenotipo ts de las muestras de virus, se incubaron las placas durante 6 días a 33ºC y 37ºC en incubadores de cultivo celular con un 5% de CO_2. Para la caracterización del fenotipo ca, se incubaron las placas a 2ºC durante 10 días. Se calculó el título de virus mediante el método de Karber y se notificó como log_{10} título de $TCID_{50}$ medio (n=4)/ml $\pm$ desviación estándar. Las deviaciones estándar de los títulos de virus presentadas en la figura 1-3 oscilaron entre 0,1 y 0,3. Se usó la diferencia en el título de virus a 33ºC y 37ºC para determinar el fenotipo ts y se usó la diferencia en el título a 25ºC y 33ºC del virus para determinar el fenotipo ca.

El virus MDV-B recombinante derivado de plásmido (recMDV-B) expresó los dos fenotipos característicos en cultivo celular, ca y ts, tal como se esperaba. El fenotipo ca, replicación eficaz a 25ºC, se mide funcionalmente como un diferencial en el título entre 25ºC y 33ºC inferior o igual a 2 log_{10} cuando se sometió a ensayo en células PCK. Tanto MDV-B original como recMDV-B expresaron ca; la diferencia entre 25ºC y 33ºC fue de 0,3 y 0,4 log10,

respectivamente (tabla 15). El fenotipo ts también se mide observando los títulos a dos temperaturas diferentes en células PCK; sin embargo, para este fenotipo el título a 37ºC debe ser inferior al título a 33ºC en 2 log_{10} o más. La diferencia entre 33ºC y 37ºC para MDV-B original y recMDV-B fue de 3,4 y 3,7 log10, respectivamente (tabla 15). Por tanto, el virus MDB-B derivado de plásmido recombinante expresaba los fenotipos tanto ca como ts.

El virus recombinante tenía un título de 7,0 log_{10} $TCID_{50}$/ml a 33ºC y 3,3 $TCID_{50}$/ml a 37ºC y 8,8 log_{10} $TCID_{50}$/ml a 25ºC (tabla 15). Por tanto, el virus recombinante derivado de la transfección con los ocho plásmidos de segmento genómico de influenza MDV-B tiene el fenotipo tanto ca como ts.

Tabla 15. Ensayo de fenotipo para MDV-B y rMDV-B generados a partir de plásmidos

Virus	Temperatura (ºC)			Fenotipo
	25	33	37	
	Log10 TCID50/ml (media + DE)			
B/Ann Arbor/01/66 ca (MDV-B)	8,8 + 0,3	8,5 + 0,05	5,1 + 0,1	ca, ts
RecMDV-B	7,4 + 0,3	7,0 + 0,13	3,3 + 0,12	ca, ts
Rec53-MDV-B	5,9 + 0,1	5,7 + 0,0	5,3 + 0,1	ca, no ts
Se infectaron células primarias de riñón de pollo con el virus MDV-B original y el virus recombinante derivado de plásmido (recMDV-B). Se determinó el título de virus a tres temperaturas diferentes.				

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

Se amplificaron los segmentos 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 simultánea por RT-PCR de los segmentos HA y NA. La comparación de las regiones terminales del ARNv que representa la región no codificante del segmento 4 (HA) y el 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 del virus influenza B. Se sintetizó un par de cebadores para RT-PCR (las secuencias subrayadas son específicas del virus influenza B) Bm-NAb-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG CA (SEQ ID NO: 79); Bm-NAb-1557R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGT AAC AAG AGC ATT TT (SEQ ID NO: 80) y se usó para amplificar simultáneamente los genes de HA y NA de diversas cepas de influenza B (figura 8). Se aislaron los fragmentos de PCR de HA y NA de B/Victoria/504/2000, B/Hawaii/10/2001 y B/Hong Kong/330/2001, se digirieron con *Bsm*BI y se insertaron en pAD3000. Estos resultados demostraron la aplicabilidad de estos cebadores para la generación eficaz de plásmidos que contienen los genes de HA y NA de influenza B a partir de varios virus de tipo natural diferentes que representan los principales linajes de influenza B. Pueden usarse los productos de RT-PCR para secuenciar y/o clonar en los plásmidos de expresión.

Con el fin de demostrar la utilidad de B/Yamanashi/166/98 (un virus similar a 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 representan los linajes tanto Victoria como Yamagata (reordenantes 6 +2). Se cotransfectaron células COS7-MDCK cocultivadas de manera transitoria con seis plásmidos que representan B/Yamanashi/166/98 y dos plásmidos que contienen el ADNc de los segmentos 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 en células MDCK nuevas. Los tres virus reordenantes 6 + 2 tenían títulos de entre 4 - 9 x 10^6 ufp/ml (tabla 16). Estos datos demostraron que los seis genes internos de B/Yamanashi/166/98 podían formar eficazmente virus infeccioso con los segmentos génicos HA y NA de ambos linajes de influenza B.

Se titularon los sobrenadantes de células COS7-MDCK cocultivadas seis o siete días tras la transfección y se determinó el título viral mediante ensayos de placas en células MDCK.

Tabla 16: Conjunto de plásmidos usados 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	**pAB281-HA**	**pAB285-HA**	**pAB287-HA**
5	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP

6	pAB256-NA	pAB256-NA	**pAB291-NA**	**pAB295-NA**	**pAB297-NA**
7	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M
8	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA
Virus recombinante		8	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[a]	0	4×10^6	9×10^6	6×10^6	7×10^6

Se obtuvieron títulos relativamente altos mediante la 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 se replicaba sólo moderadamente en huevos, con el rendimiento del reordenante 6 + 2 que expresaba HA y NA de B/Victoria/504/2000. Se inocularon cada uno de estos virus, además de B/Yamanashi/166/9R tipo natural y recombinante, en 3 ó 4 huevos de pollo embrionados, a o bien 100 o bien 1000 ufp. Tres días tras la infección, se recogieron los líquidos alantoideos de los huevos y se determinaron los títulos de $TCID_{50}$ en células MDCK. Los reordenantes 6 + 2 produjeron cantidades similares de virus en el líquido alantoideo con respecto 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 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ (0,7-2,5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/ml, IC del 95%). Se confirmó la diferencia entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6 + 2 en tres experimentos separados (P <0,001). Estos resultados demostraron que podían conferirse las propiedades de crecimiento en huevos de B/Yamanashi/166/98 a antígenos de HA y NA que normalmente se expresan 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 MDV-B (B/Ann Arbor/1/66 ca) se atenúa 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 MDV-B con secuencias en la base datos de influenza Los Alamos (de la web en: flu.lanl.gov) usando el algoritmo de búsqueda BLAST. Se identificaron ocho aminoácidos únicos para MDV-B y no presentes en ninguna otra cepa (tabla 17). Los segmentos genómicos que codifican para PB1, BM2, NS1 y NS2 no muestran residuos sustituidos únicos. Las proteínas PA y M1 tienen cada una dos, y la proteína NP tiene cuatro aminoácidos sustituidos únicos (tabla 17). Se encuentra un aminoácido sustituido en PB2 en la posición 630 (una cepa adicional 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 pueden estar implicados en el fenotipo atenuado de MDV-B. De una manera análoga a la descrita anteriormente para MDV-A, puede utilizarse el sistema de ocho plásmidos para generar recombinantes y reordenantes (individuales y/o dobles, es decir, reordenantes 7:1; 6:2) de manera independiente auxiliar simplemente mediante la cotransfección de los plásmidos relevantes en células en cultivo tal como se describió anteriormente con respecto a MDV-A. Por ejemplo, los 6 genes internos de B/Lcc/40 pueden usarse conjuntamente con los segmentos HA y NA derivados de MDV-B para genera reordenantes 6 + 2.

Tabla 17. Aminoácidos sustituidos únicos 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	AG**A**	Ser630	AG**C**	23
PA	2	431	Met431	**A**TG	Val431	**G**TG	23
		497	His497	**C**AT	Tyr497	**T**AT	
NP	4	55	Ala55	**G**CC	Thr55	**A**CC	26
		114	Ala114	G**C**G	Val114	G**T**G	
		410	His410	C**A**T	Pro410	C**C**T, CCC	
		509	Thr509	G**A**C	Ala509	G**G**C	
M1	2	159	Gln159	CA**A**	His159	CA**T**	24
		183	Val183	**G**TG	M183	**A**TG	

BM2	0	-	-	24
NS 1	0	-	-	80
NS2	0	-	-	80

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

Con el fin de determinar si las 8 diferencias de aminoácidos únicos tenían algún efecto sobre los fenotipos característicos de MDV-B, se construyó un virus recombinante en el que las ocho posiciones de nucleótido codificaban para el aminoácido que refleja el complemento genético de influenza de tipo natural. Se construyeron un conjunto de plásmidos en los que se cambiaron los ocho residuos de los genes de PA, NP y M1 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, designado rec53-MDV-B, mediante cotransfección de los plásmidos construidos en células COS7-MDCK cocultivadas. El cocultivo de células MDCK y el crecimiento a 33ºC 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 en células MDCK mediante ensayo de placas y células PCK a 33ºC y 37ºC.

Tal como se muestra en la figura 13, en dos experimentos independientes diferentes, recMDV-B expresó el fenotipo ts tanto en células MDCK como en células PCK. El virus reordenante triple rec53-MDV-B designado que alberga los ocho cambios de aminoácidos expresó el fenotipo no ts, la diferencia en el título entre 33ºC y 37ºC fue sólo de 0,7 $\log_{10}$ en células PCK. Este título era inferior a la diferencia de 2 $\log_{10}$ requerida característica de la definición de ts y era significativamente inferior a la diferencia de ~3 $\log_{10}$ observada con recMDV-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 de tipo natural, no ts, con glicoproteínas tanto homólogas como heterólogas.

Entonces se determinó la contribución de cada segmento génico al fenotipo ts. Se generaron recombinantes derivados de plásmido que albergaban el segmento génico o bien PA, NP o bien M con el complemento de aminoácido de tipo natural mediante la técnica de cotransfección de ADN. Todos los recombinantes de genes individuales mostraron restricción del crecimiento a 37ºC en células MDCK y en células PCK (figura 14), lo que indica que cambios en segmentos génicos no individuales podían revertir el fenotipo ts. Además, los virus recombinantes que portaban los segmentos génicos tanto NP como M o tanto PA como M juntos también conservaban el fenotipo ts. En contraposición, los virus recombinantes que albergaban los segmentos génicos tanto PA como NP tenían una diferencia en el título entre 37ºC y 33ºC de 2,0 $\log_{10}$ o menos, similar a rec53-MDV-B. Estos resultados muestran que los genes de NP y PA tienen una contribución principal al fenotipo ts.

Para determinar si los cuatro aminoácidos en la proteína NP y dos en la proteína PA contribuyen a no ts, se generaron recombinantes de genes dobles y genes triples con genes de NP y PA alterados (figura 15). La sustitución de dos aminoácidos A114 → V114 y H410 → P410 dio como resultado un fenotipo no ts. Los virus con sustitución individual H410 → P410 en la nucleoproteína mostraron fenotipo no ts en MDCK y PCK. Por otra parte, la sustitución individual A55 → T55 mostró un fenotipo ts. Estos resultados indican que P410 en NP está implicado en el crecimiento eficaz a 37ºC. Estos resultados muestran que a partir de los seis aminoácidos de PA y NP cuatro residuos contribuyen al fenotipo no ts.

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

Se realizaron pases de virus recombinantes obtenidos tras la transfección en huevos de pollo embrionados para producir una reserva de virus. Se inocularon hurones de nueve semanas de edad por vía intranasal con 0,5 ml por orificio nasal de virus con títulos de 5,5, 6,0 ó 7,0 $\log_{10}$ ufp/ml. Tres días tras la infección, se sacrificaron los hurones y se examinaron sus pulmones y cornetes tal como se describió anteriormente.

Se infectaron hurones (cuatro animales en cada grupo) por vía intranasal con recMDV-B o rec53-MDV-B. Tres días tras la infección con el virus se recogieron los cornetes nasales y tejido pulmonar y se sometió a prueba la existencia del virus. No se detectó virus en los tejidos pulmonares de hurones infectados con 7,0 $\log_{10}$ ufp de recMDV-B. De los cuatro animales infectados con virus rec53-MDV-B con 7,0 $\log_{10}$ ufp, en tres animales se detectó virus en el tejido pulmonar (un animal en este grupo por motivos desconocidos). En dos de cuatro tejidos pulmonares de hurones infectados con rec53-MDV-B a una dosis inferior (5,5 log ufp/ml) pudo aislare virus del tejido pulmonar. Por tanto, el

cambio de los ocho aminoácidos únicos en la proteína PA, NP y M1 a residuos de tipo natural fue suficiente para convertir un fenotipo att en un fenotipo no att.

Puesto que los datos en cultivo celular mostraron que PA y NP son los principales elementos de contribución al fenotipo ts, en un segundo experimento, se infectaron hurones con rec53-MDV-B (PA, NP, M), rec62-MDV-B (PA), NP rec71-MDV-B (NP) con 6 log ufp. Dos de cuatro animales infectados con rec53-MDV-B tenían virus en el pulmón. Ninguno de los tejidos pulmonares de hurones infectados con virus reordenantes individuales y dobles 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. Los virus con PA y NP de tipo natural no se replicaron en el pulmón de hurón lo que indica que un subconjunto de las mutaciones implicadas en la atenuación están implicadas en el fenotipo ts.

Por tanto, los fenotipos ts y att de B/Ann Arbor/1/66 están determinados por tres genes como máximo. 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 replicaba eficazmente a 37ºC. De manera similar, un virus recombinante 6 + 2 que representaba los seis genes internos de MDV-B con los segmentos HA y NA de B/HongKong/330/01 mostró un fenotipo ts y el recombinante triple era no ts.

Tal como se describió anteriormente con respecto a cepas de influenza A, la sustitución de los residuos indicados anteriormente, por ejemplo $PB2^{630}$ (S630R); PA^{431} (V431M); PA^{497} (Y497H); NP^{55} (T55A); NP^{114} (V114A); NP^{410} (P410H); NP^{510} (A510T); $M1^{159}$ (H159Q) y $M1^{153}$ (M183V) confiere los fenotipos ts y att. Por consiguiente, las variantes modificadas artificialmente por ingeniería genética del virus de la cepa de influenza B que tienen una o más de estas sustituciones de aminoácido presentan los fenotipos ts y att y son adecuadas para su uso, por ejemplo, como virus de cepa donadora maestra, en la producción de vacunas con virus influenza vivo atenuado.

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

Previamente se ha sugerido que puede rescatarse influenza A recombinante 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 lipídicos y se ha documentado sólo para una única cepa de cepas de laboratorio de replicación altamente competente de influenza A (A/WSN/33 y A/PR/8/34), lo que lo hace de aplicación limitada en la producción de virus atenuados vivos adecuados para la producción de vacunas. La presente invención proporciona un método novedoso para recuperar virus influenza recombinantes de células Vero usando electroporación. Estos métodos son adecuados para la producción de los virus de la cepa tanto influenza A como influenza B, y permiten la recuperación de, por ejemplo, virus adaptados al frío, sensibles a la temperatura, atenuados a partir de células Vero hechas crecer en condiciones libres de suero que facilitan la preparación de una vacuna atenuada viva adecuada para su administración en, por ejemplo, formulaciones de vacuna intranasales. Además de su amplia aplicabilidad en todas las cepas de virus, la electroporación no requiere reactivos adicionales distintos al medio de crecimiento para el sustrato celular y por tanto tiene menos posibilidad de contaminantes no deseados. En particular, este método es eficaz para generar virus recombinantes y reordenantes usando células Vero adaptadas al crecimiento en condiciones libres de suero, tal como aislados de células Vero calificados como libres de patógenos y adecuados para la producción de vacunas. Esta característica apoya la elección de la electroporación como 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 transfección usando numerosos reactivos basados en lípidos, precipitación con fosfato de calcio y microinyección de células. Aunque se obtuvo algún éxito usando reactivos basados en lípidos para el rescate de influenza A, sólo la electroporación demostró que rescataba influenza B así como influenza A de células Vero.

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

Se mezcló el contenido de la cubeta suavemente mediante ligeros golpes y 1-2 min tras la electroporación se añadieron 0,7 ml de MEM, FBS al 10% con una pipeta de 1 ml. Entonces se mezclaron suavemente de nuevo las

células pipeteando hacia arriba y hacia abajo algunas veces y luego se dividieron entre dos pocillos de una placa de 6 pocillos que contenía 2 ml por pocillo de MEM, FBS al 10%. Entonces se lavó la cubeta con 1 ml de MEM, FBS al 10% y se dividió el contenido entre los dos pocillos para un volumen final de aproximadamente 3,5 ml por pocillo.

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

Entonces se hicieron crecer las células sometidas a electroporación en condiciones apropiadas para la replicación y la recuperación del virus introducido, es decir, a 33ºC 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 u OptiPro (SFM). Se añadió un ml por pocillo de OptiMEM I u OptiPro (SFM) que contenía pen./estrep. a cada pocillo y se recogieron los sobrenadantes diariamente sustituyendo los medios. Se almacenaron los sobrenadantes a -80ºC en SPG. Normalmente se observó la producción de virus pico entre 2 y 3 días tras la electroporación.

Tabla 18: Resultados de rescate de 8 plásmidos de cepas de MDV en diferentes tipos celulares y mediante diferentes métodos de transfección

Sustrato	**Método**	**N.º de prueba**	**Resultado (virus infeccioso recuperado)**
	MDV-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)
	MDV-A		
Vero (suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)
Vero (libres de suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)

EJEMPLO 10: SISTEMA DE VECTORES DE VIRUS INFLUENZA PARA SUMINISTRO GÉNICO

Los vectores de la presente invención también pueden usarse como sistemas de suministro génico 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, debido a que el segmento 7 del virus influenza B no experimenta 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 fluorescente verde potenciada (EGFP). Usando el sistema de vectores basado en plásmidos de la presente invención, se clona el ADNc que codifica para el marco de lectura abierto de M1-EGFP y 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 transcripción. Alternativamente, se construyen dos plásmidos: uno que contiene el ORF de M1 y el otro que contiene EGFP-BM2.

La cotransfección 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 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 microneutralización. La combinación de la tecnología basada en plásmidos y la simple detección de la expresión de proteínas (la fluorescencia derivada de EGFP puede monitorizarse mediante microscopía, tal como se ilustra en la figura 2), permite la optimización de la expresión de proteínas.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir virus influenza B infecciosos en cultivo celular, comprendiendo el método:

   i) someter a electroporación una población de células Vero con una pluralidad de vectores de plásmido que comprenden secuencias de ácido nucleico de un genoma de virus influenza B;

   ii) cultivar la población de células Vero en condiciones permisivas para la replicación viral; y,

   iii) recuperar una pluralidad de virus influenza B infecciosos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que los virus influenza B presentan uno o más atributos fenotípicos seleccionados del grupo que consiste en: sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y atenuación.

3. Método según la reivindicación 1, en el que los virus influenza B comprenden un virus influenza atenuado, adaptado al frío, sensible a la temperatura.

4. Método según la reivindicación 1, que comprende cultivar las células Vero en medio libre de suero.

5. Método según la reivindicación 1, en el que las condiciones permisivas para la replicación viral comprenden cultivar las células Vero a una temperatura inferior o igual a 35ºC.

6. Método según la reivindicación 1, en el que las condiciones permisivas para la replicación viral comprenden cultivar las células Vero a una temperatura de 33ºC.

7. Método según la reivindicación 1, en el que el virus influenza B es adecuado para su administración en una formulación de vacuna intranasal.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la pluralidad de vectores de plásmido son ocho vectores de plásmido.

9. Método según la reivindicación 1, en el que no hay virus auxiliar.

Figura 1

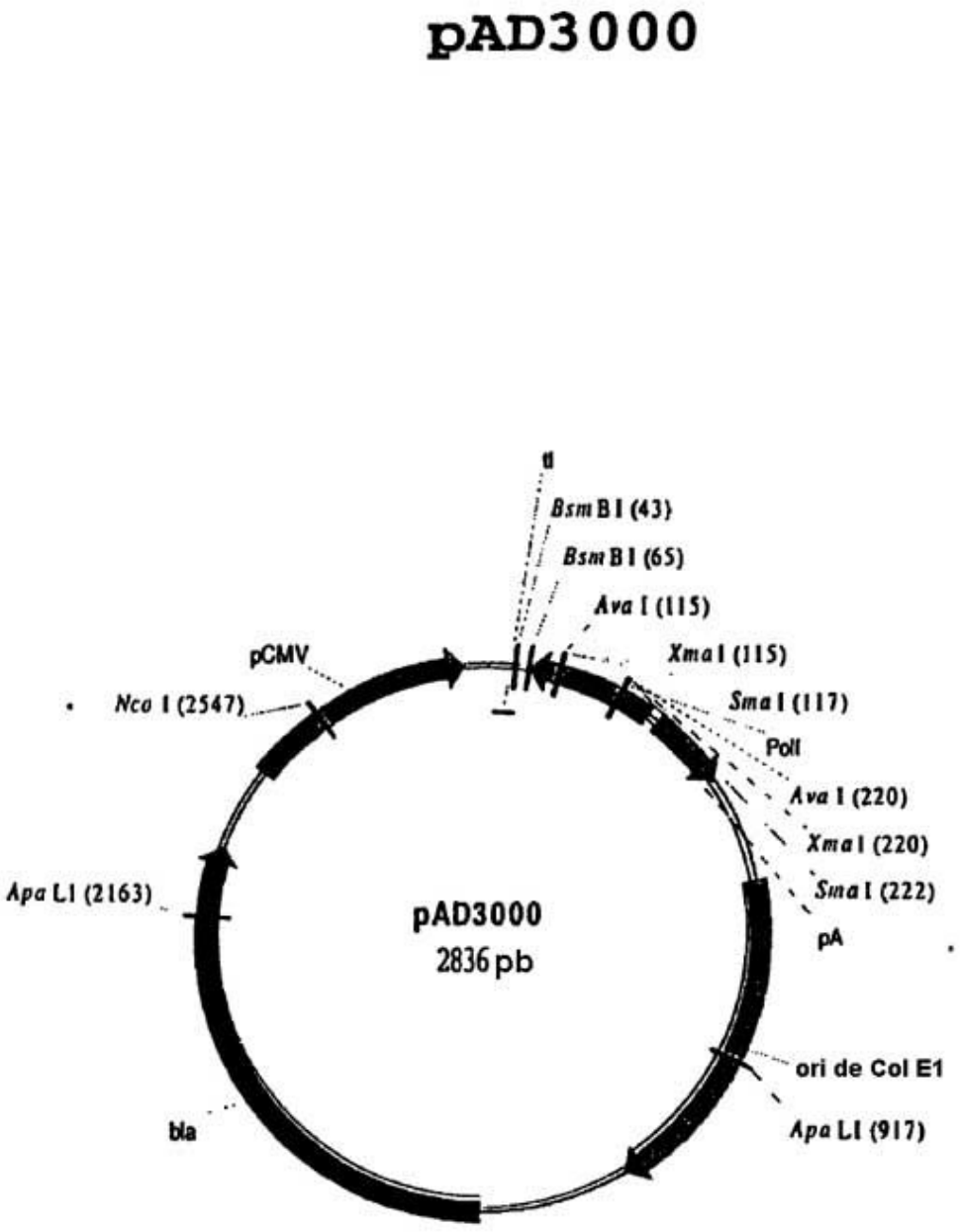

pAD3000
tl
Bsm B I (43)
Bsm B I (65)
Ava I (115)
Xma I (115)
Sma I (117)
Poll
Ava I (220)
Xma I (220)
Sma I (222)
pA
ori de Col E1
Apa LI (917)
bla
Apa LI (2163)
Nco I (2547)
pCMV
pAD3000
2836 pb

Figura 2

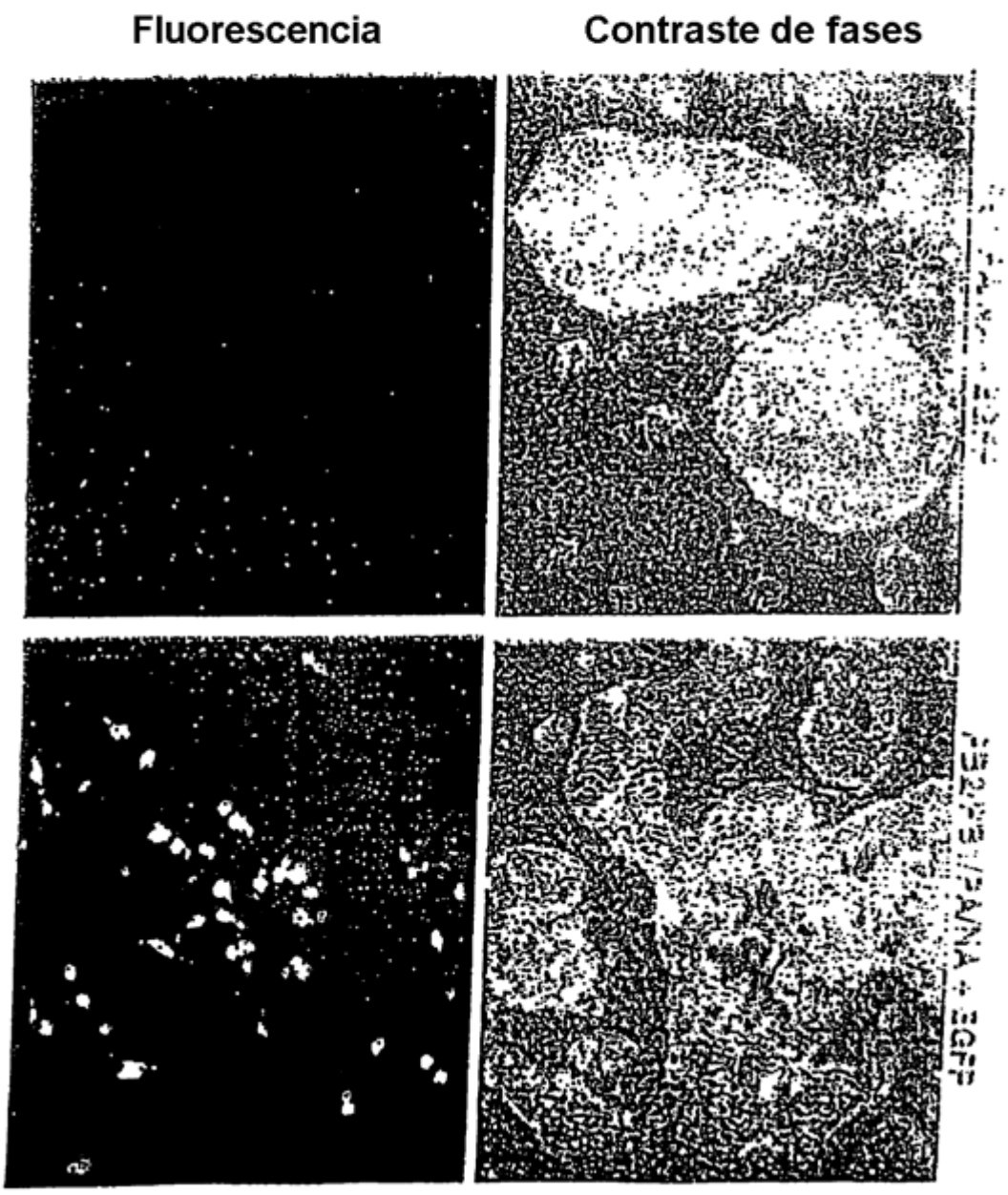


Figura 3

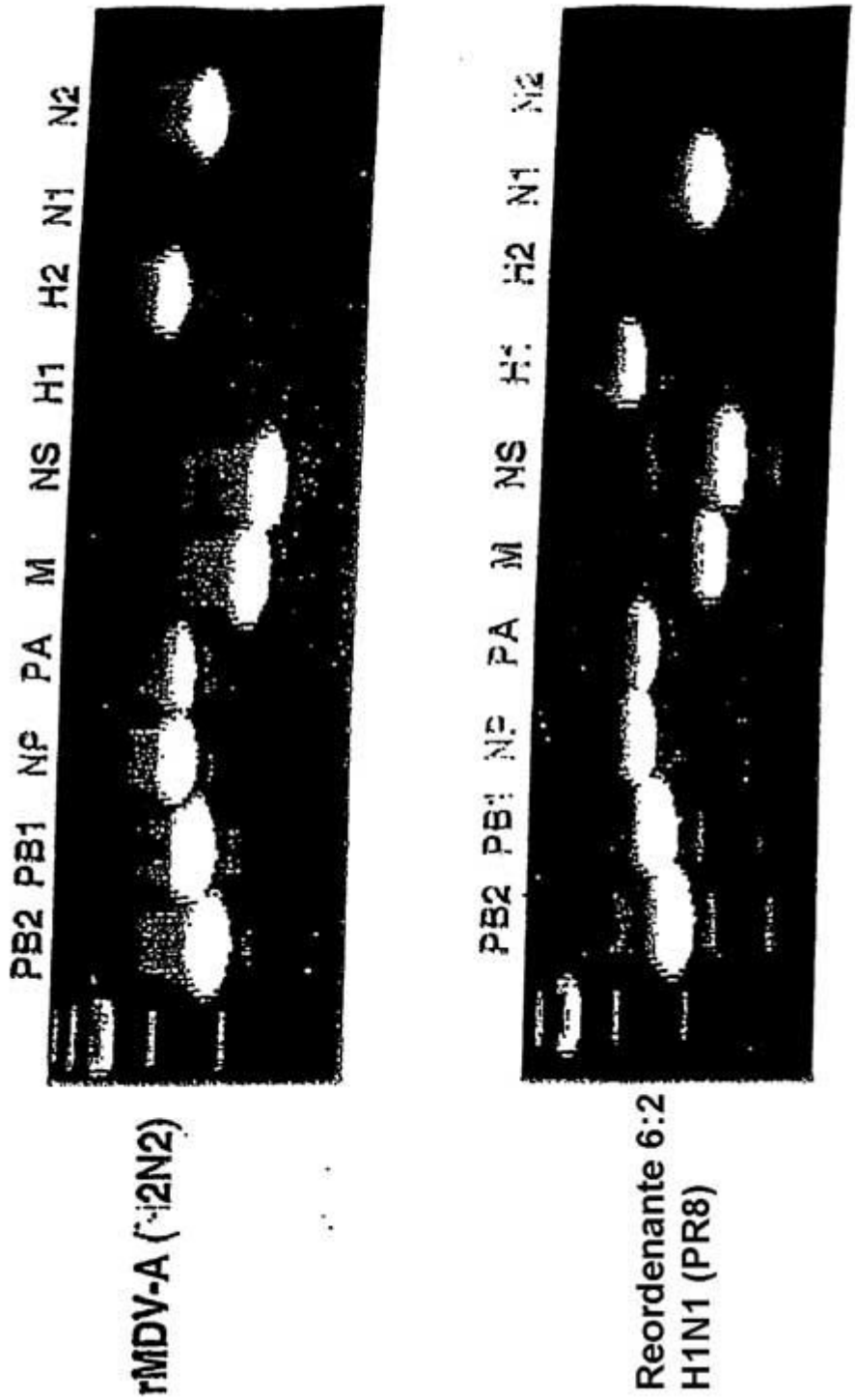

PB2 PB1 NP PA M NS H1 H2 N1 N2
rMDV-A (H2N2)
PB2 PB1 NP PA M NS H2 N1 N2
Reordenante 6:2
H1N1 (PR8)

Figura 4

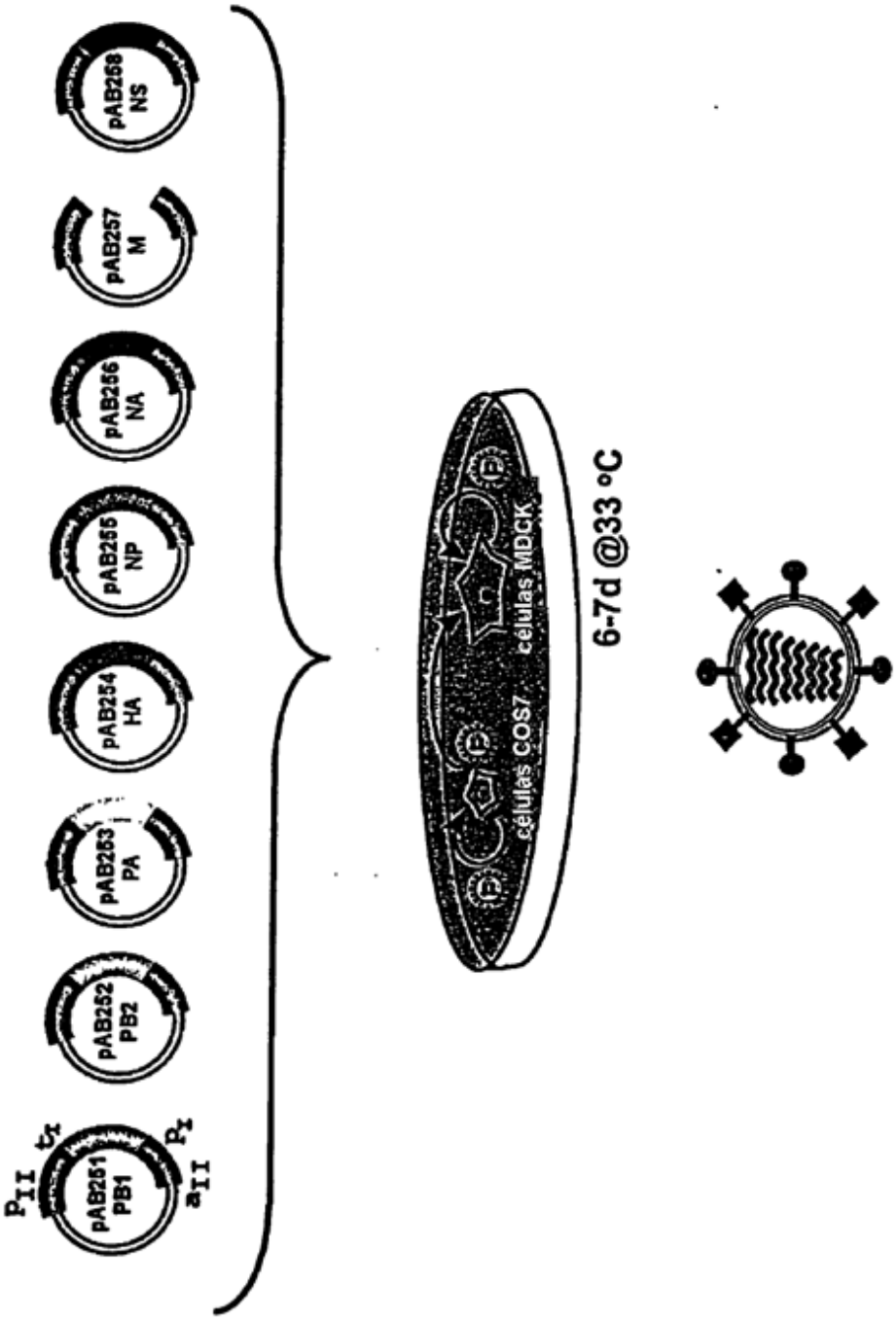

pAB251 PB1
pAB252 PB2
pAB253 PA
pAB254 HA
pAB255 NP
pAB256 NA
pAB257 M
pAB258 NS
células COS7
células MDCK
6-7d @33 °C

Figura 5

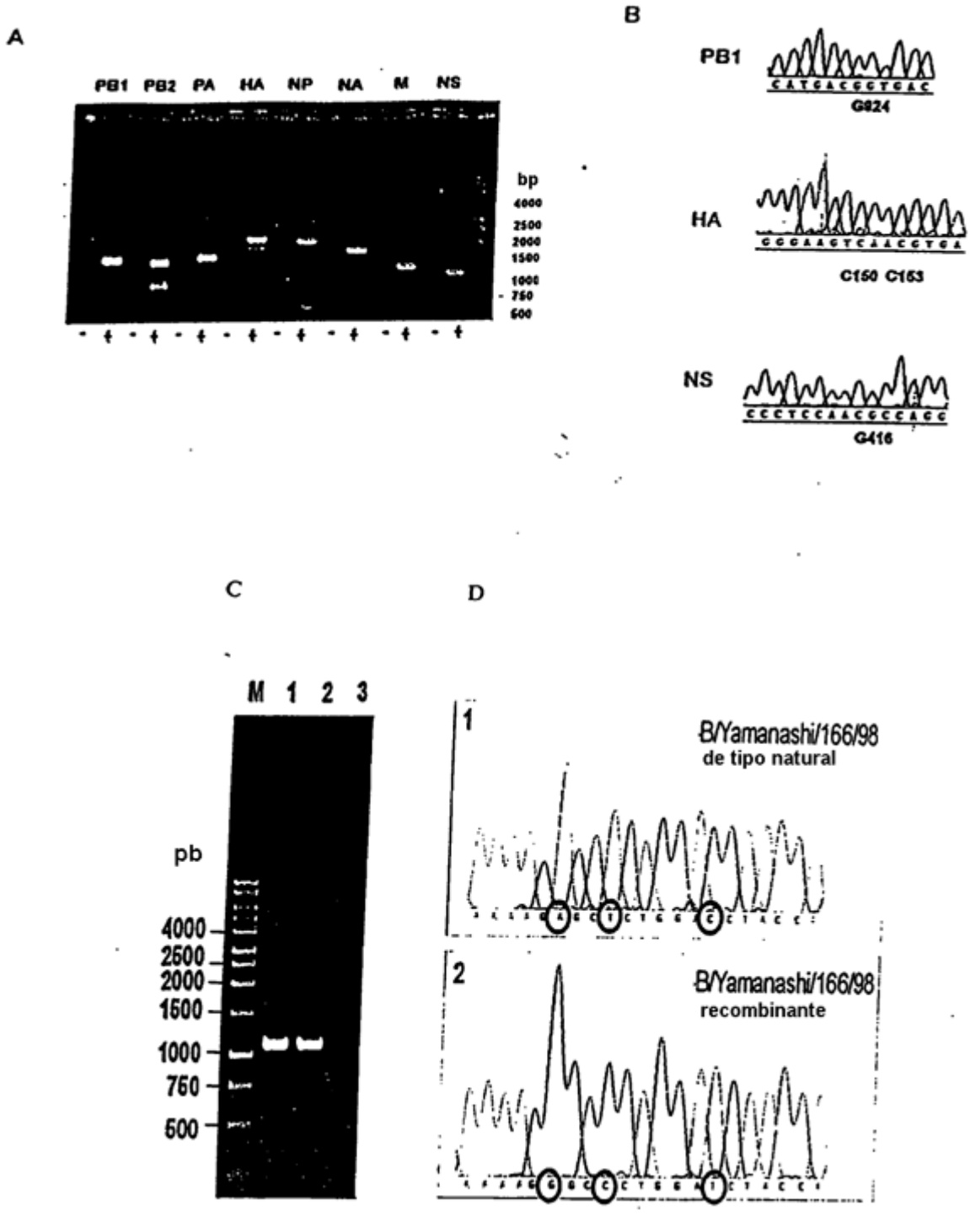

A
PB1 PB2 PA HA NP NA M NS
bp
4000
2500
2000
1500
1000
750
500
B
PB1
G824
HA
C150 C153
NS
G416
C
M 1 2 3
pb
4000
2500
2000
1500
1000
750
500
D
1
B/Yamanashi/166/98
de tipo natural
2
B/Yamanashi/166/98
recombinante

Figura 6

Secuencia en formato de Genbank (SEQ ID NO:75)

LOCUS pAD3000 2836 pb ADN circular 14-ENE-2002

DEFINICIÓN Derivado de pHW2000 con señal de poliA de SV40 que sustituye a BGH

CARACTERÍSTICAS	Ubicación/calificadores
promotor	2420..2799 /vntifkey="29" / etiqueta =pCMV / nota = "promotor de CMV truncado (correspondiente a la region 484-863 de pcDNA3)"
misc_ marcador	1422..2282 /vntifkey="22" / etiqueta = bla / nota = "beta-lactamasa"
origen_rep	612..1172 /vntifkey="33" / etiqueta = ori de ColE1 / nota = "origen de replicación de Col E1"
terminador	11..45 /vntifkey="43" / etiqueta = tl / nota = "terminador de Pol I"
promotor	complemento (65..276) /vntifkey="29" / etiqueta = Pol I / nota = "promotor de Pol I humano"
exón	296..430 /vntifkey="61" / etiqueta = pA / nota = "pA (SV40)"

RECUENTO DE BASES 717 a 734 c 703 g 682 t

ORIGEN

```
   1 ctagcagtta accggagtac tggtcgacct ccgaagttgg gggggaggag acggtaccgt
  61 ctccaataac ccggcggccc aaaatgccga ctcggagcga aagatatacc tcccccgggg
 121 ccgggaggtc gcgtcaccga ccacgccgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg
 181 tccccaaaaa cgccaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggtcaaccc
 241 caggacacac gcgggagcag cgccgggccg gggacgccct cccggcggtc acctcagaca
 301 tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct
 361 ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac
 421 aaggatctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc
 481 tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta
 541 tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag
 601 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
 661 tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg
 721 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg
 781 cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgccttttt cccttcggga
 841 agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc
 901 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt
 961 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact
1021 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg
1081 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
1141 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt
1201 ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
1261 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg
1321 gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt
```

```
1381 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt
1441 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc
1501 gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc aatgataccg
1561 cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc
1621 gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg
1681 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca
1741 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga
1801 tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct
1861 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg
1921 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca
1981 accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata
2041 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct
2101 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact
2161 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa
2221 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc
2281 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga
2341 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga
2401 aaagtgccac ctgacgtcga tatgccaagt acgccccctа ttgacgtcaa tgacggtaaa
2461 tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac
2521 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg
2581 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg
2641 agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca
2701 ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg
2761 ctaactagag aacccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctatagggag
2821 acccaagctg ttaacg
//
```

Figura 7

ALINEACIÓN DE SECUENCIAS CONSENSO DE MDV-B CON ADNc EN LOS OCHO PLÁSMIDOS (PAB12 [N-SEGMENTO])

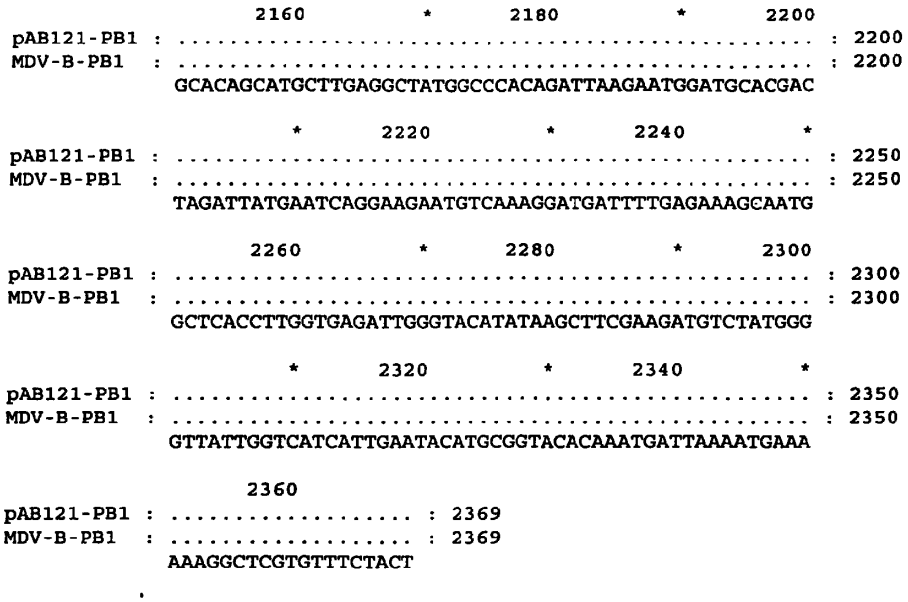
PB1

```
                       *        20         *        40         *
pAB121-PB1 : .................................................. :  50
MDV-B-PB1  : .................................................. :  50
             AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATGAATATAAATCCTTATTTTCTCTTCAT

                      60         *        80         *       100
pAB121-PB1 : .................................................. : 100
MDV-B-PB1  : .................................................. : 100
             AGATGTACCCATACAGGCAGCAATTTCAACAACATTCCCATACACCGGTG

                       *       120         *       140         *
pAB121-PB1 : .................................................. : 150
MDV-B-PB1  : .................................................. : 150
             TTCCCCCTTATTCCCATGGAACGGGAACAGGCTACACAATAGACACCGTG

                     160         *       180         *       200
pAB121-PB1 : .................................................. : 200
MDV-B-PB1  : .................................................. : 200
             ATTAGAACACATGAGTACTCAAACAAGGGAAAACAATACATTTCTGATGT

                       *       220         *       240         *
pAB121-PB1 : .................................................. : 250
MDV-B-PB1  : .................................................. : 250
             TACAGGATGTGCAATGGTAGATCCAACAAATGGGCCATTACCCGAAGATA

                     260         *       280         *       300
pAB121-PB1 : .................................................. : 300
MDV-B-PB1  : .................................................. : 300
             ATGAGCCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGCGTTCTGGAGGCTTTGGAT

                       *       320         *       340         *
pAB121-PB1 : .................................................. : 350
MDV-B-PB1  : .................................................. : 350
             AGAATGGATGAAGAACATCCAGGTCTGTTTCAAGCAGCCTCACAGAATGC

                     360         *       380         *       400
pAB121-PB1 : .................................................. : 400
MDV-B-PB1  : .................................................. : 400
             CATGGAGGCACTAATGGTCACAACTGTAGACAAATTAACCCAGGGGAGAC

                       *       420         *       440         *
pAB121-PB1 : .................................................. : 450
MDV-B-PB1  : .................................................. : 450
             AGACTTTTGATTGGACAGTGTGCAGAAACCAACCTGCTGCAACGGCACTG

                     460         *       480         *       500
pAB121-PB1 : .................................................. : 500
MDV-B-PB1  : .................................................. : 500
             AACACAACAATAACCTCTTTTAGGTTGAATGATTTGAATGGAGCCGACAA
```

```
                       *       520         *       540         *
pAB121-PB1 : .................................................. :  550
MDV-B-PB1  : .................................................. :  550
             GGGTGGATTAGTACCCTTTTGCCAAGATATCATTGATTCATTGGACAAAC

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

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

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

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

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

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

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

                       *       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
             GAGACAGCCCAATTTGGTTCCGGGATTTTTGTAGTATAGCACCGGTCTTG
```

```
                     1060        *       1080        *       1100
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
             CATTAGAAAGATATAATGAAGAAACAAGGGCAAAATTAAAAAAGCTGAAA

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

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

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

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

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

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

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

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

```
                    *      1620         *      1640         *
pAB121-PB1 : ................................................ : 1650
MDV-B-PB1  : ................................................ : 1650
             CAATAATAAAGAACAATATGATCAACAATGGGATGGGTCCAGCAACAGCA

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

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

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

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

                  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
             ATAACCCCAGCACATGGTCCAGTAAAGAAAATGGACTATGATGCGGTATC

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

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

                    *      2120         *      2140         *
pAB121-PB1 : ................................................ : 2150
MDV-B-PB1  : ................................................ : 2150
             CTTTTTGAGGCCTGTTTTAACAGTGCATCATACAGGAAACCAGTAGGTCA
```


2160 * 2180 * 2200
pAB121-PB1 : ..... : 2200
MDV-B-PB1 : ..... : 2200
GCACAGCATGCTTGAGGCTATGGCCCACAGATTAAGAATGGATGCACGAC
* 2220 * 2240 *
pAB121-PB1 : ..... : 2250
MDV-B-PB1 : ..... : 2250
TAGATTATGAATCAGGAAGAATGTCAAAGGATGATTTTGAGAAAGCAATG
2260 * 2280 * 2300
pAB121-PB1 : ..... : 2300
MDV-B-PB1 : ..... : 2300
GCTCACCTTGGTGAGATTGGGTACATATAAGCTTCGAAGATGTCTATGGG
* 2320 * 2340 *
pAB121-PB1 : ..... : 2350
MDV-B-PB1 : ..... : 2350
GTTATTGGTCATCATTGAATACATGCGGTACACAAATGATTAAAATGAAA
2360
pAB121-PB1 : ..... : 2369
MDV-B-PB1 : ..... : 2369
AAAGGCTCGTGTTTCTACT

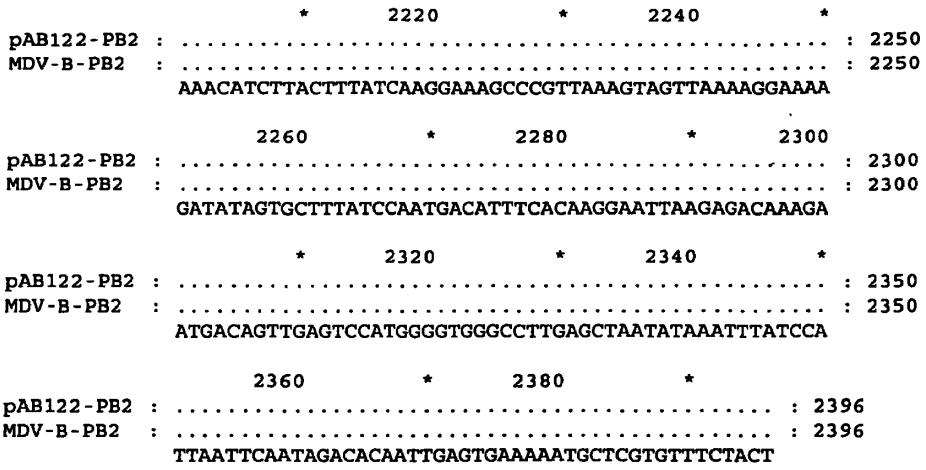
PB2

```
                       *        20         *        40         *
pAB122-PB2 : .................................................. :  50
MDV-B-PB2  : .................................................. :  50
             AGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAGATGACATTGGCCAAAATTGAATTGTTA

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

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

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

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

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

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

                     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
             TGAGAAAAAGGGTACTGCTAAACCCTCTCACCAAGGAAATGCCTCCAGAT

                       *       520         *       540         *
pAB122-PB2 : .................................................. : 550
MDV-B-PB2  : .................................................. : 550
             GAAGCGAGCAATGTGATAATGGAAATATTGTTCCCTAAAGAAGCAGGAAT
```

```
                    560         *       580         *       600
pAB122-PB2 : ..................................................... :  600
MDV-B-PB2  : ..................................................... :  600
             ACCAAGAGAATCTACTTGGATACATAGGGAACTGATAAAAGAAAAAAGAG

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

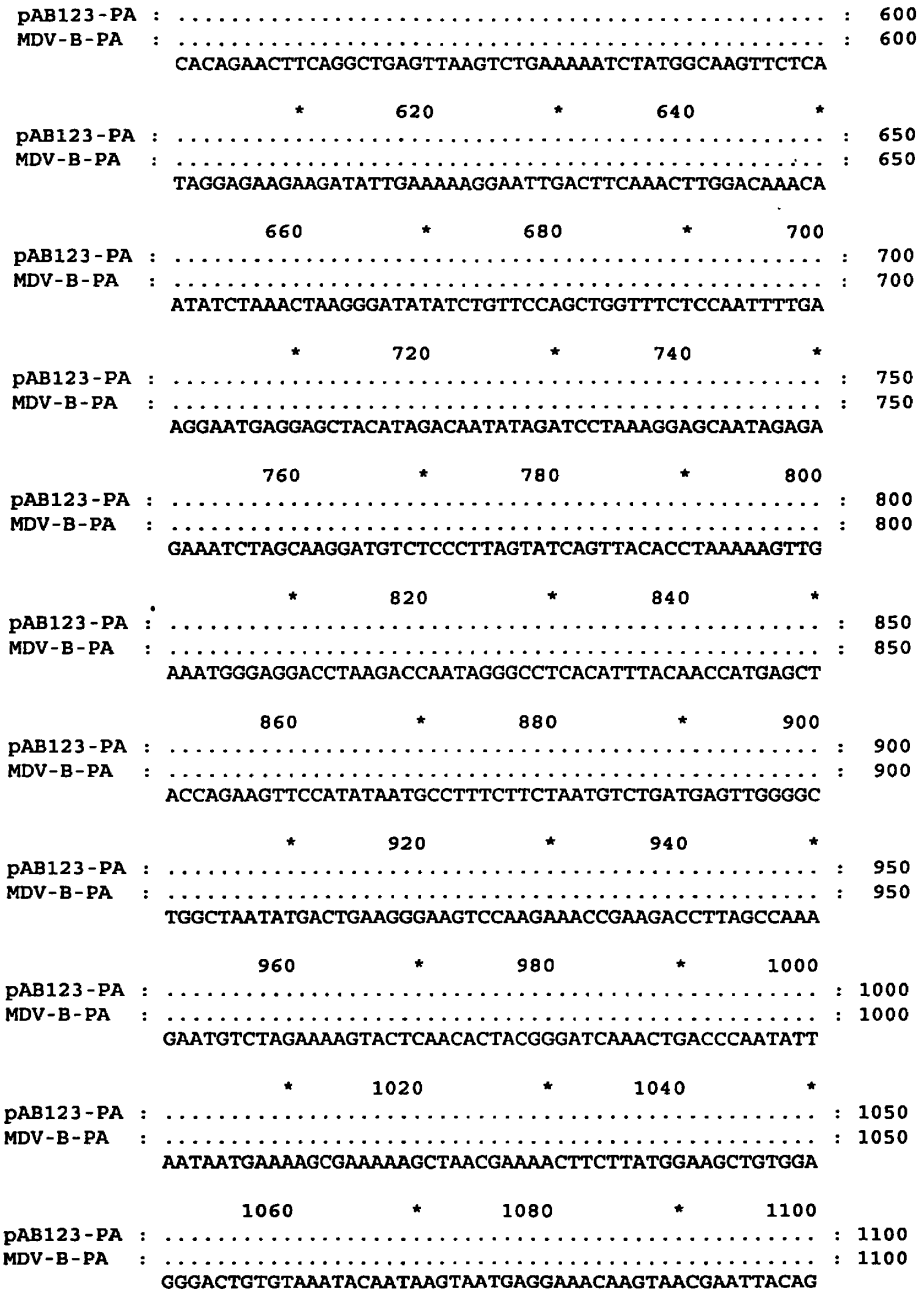
```
                     *      1120        *      1140        *
pAB122-PB2 : .................................................. : 1150
MDV-B-PB2  : .................................................. : 1150
             GACGGAGAAGAGGAGTTCCATGTAAGATGTGGTGAATGCAGGGGAATATT

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

                     *      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
             GGAGCAACGACCTTTTTGATCAATGGGGGTATGAGGAATCACCCAAAGCA

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

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

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

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

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

```
                    1660         *      1680         *      1700
pAB122-PB2 : ..................................................... : 1700
MDV-B-PB2  : ..................................................... : 1700
             CCAAAGAACTGGTGCAAAACACCTACCAATGGGTGCTAAAAAATTTGGTA

                       *      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
             ATGAAAACTGACCAGTTCATAAAGTTGTTGCCTTTCTGTTTCTCACCACC

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

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

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

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

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

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


* 2220 * 2240 *
pAB122-PB2 : ..... : 2250
MDV-B-PB2 : ..... : 2250
AAACATCTTACTTTATCAAGGAAAGCCCGTTAAAGTAGTTAAAAGGAAAA
2260 * 2280 * 2300
pAB122-PB2 : ..... : 2300
MDV-B-PB2 : ..... : 2300
GATATAGTGCTTTATCCAATGACATTTCACAAGGAATTAAGAGACAAAGA
* 2320 * 2340 *
pAB122-PB2 : ..... : 2350
MDV-B-PB2 : ..... : 2350
ATGACAGTTGAGTCCATGGGGTGGGCCTTGAGCTAATATAAATTTATCCA
2360 * 2380 *
pAB122-PB2 : ..... : 2396
MDV-B-PB2 : ..... : 2396
TTAATTCAATAGACACAATTGAGTGAAAAATGCTCGTGTTTCTACT

PA

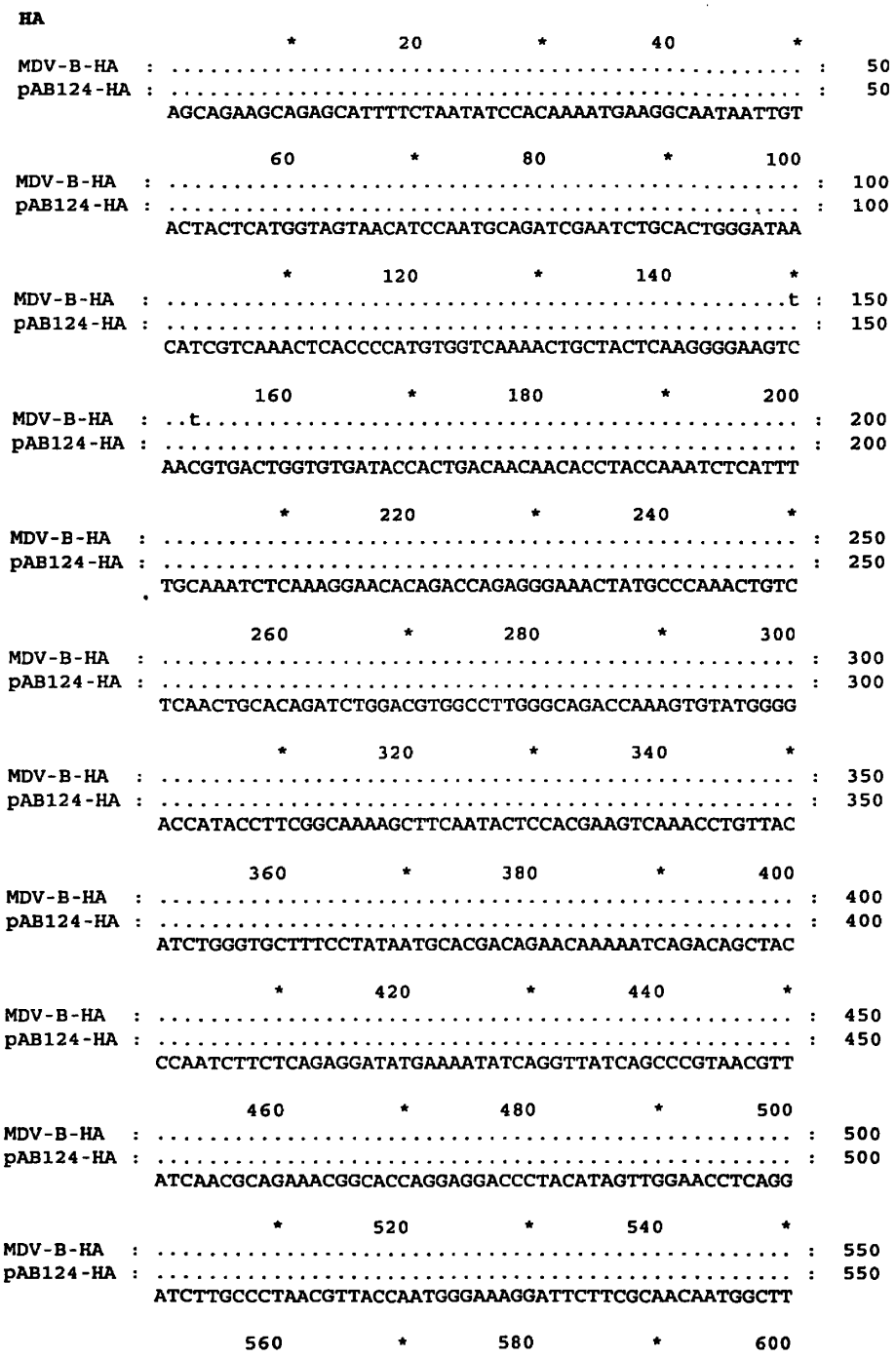
```
                       *        20         *        40         *
pAB123-PA : .................................................. :   50
MDV-B-PA  : .................................................. :   50
            AGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTTGCCATAATGGATACTTTTATTACAAGA

                  60         *        80         *       100
pAB123-PA : .................................................. :  100
MDV-B-PA  : .................................................. :  100
            AACTTCCAGACTACAATAATACAAAAGGCCAAAAACACAATGGCAGAATT

                       *       120         *       140         *
pAB123-PA : .................................................. :  150
MDV-B-PA  : .................................................. :  150
            TAGTGAAGATCCTGAATTACAACCAGCAATGCTATTCAACATCTGCGTCC

                 160         *       180         *       200
pAB123-PA : .................................................. :  200
MDV-B-PA  : .................................................. :  200
            ATCTGGAGGTCTGCTATGTAATAAGTGATATGAATTTTCTTGATGAAGAA

                       *       220         *       240         *
pAB123-PA : .................................................. :  250
MDV-B-PA  : .................................................. :  250
            GGAAAAACATATACAGCATTAGAAGGACAAGGAAAAGAACAAAACTTGAG

                 260         *       280         *       300
pAB123-PA : .................................................. :  300
MDV-B-PA  : .................................................. :  300
            ACCACAATATGAAGTGATTGAGGGAATGCCAAGAAACATAGCATGGATGG

                       *       320         *       340         *
pAB123-PA : .................................................. :  350
MDV-B-PA  : .................................................. :  350
            TTCAAAGATCCTTAGCCCAAGAGCATGGAATAGAGACTCCAAGGTATCTG

                 360         *       380         *       400
pAB123-PA : .................................................. :  400
MDV-B-PA  : .................................................. :  400
            GCTGATTTGTTCGATTATAAAACCAAGAGGTTTATAGAAGTTGGAATAAC

                       *       420         *       440         *
pAB123-PA : .................................................. :  450
MDV-B-PA  : .................................................. :  450
            AAAGGGATTGGCTGACGATTACTTTTGGAAAAAGAAAGAAAAGCTGGGGA

                 460         *       480         *       500
pAB123-PA : .................................................. :  500
MDV-B-PA  : .................................................. :  500
            ATAGCATGGAACTGATGATATTCAGCTACAATCAAGACTATTCGTTAAGT

                       *       520         *       540         *
pAB123-PA : .................................................. :  550
MDV-B-PA  : .................................................. :  550
            AATGAATCCTCATTGGATGAGGAAGGAAAAGGGAGAGTGCTAAGCAGACT

                 560         *       580         *       600
```


pAB123-PA : ..... : 600
MDV-B-PA : ..... : 600
CACAGAACTTCAGGCTGAGTTAAGTCTGAAAAATCTATGGCAAGTTCTCA
* 620 * 640 *
pAB123-PA : ..... : 650
MDV-B-PA : ..... : 650
TAGGAGAAGAAGATATTGAAAAAGGAATTGACTTCAAACTTGGACAAACA
660 * 680 * 700
pAB123-PA : ..... : 700
MDV-B-PA : ..... : 700
ATATCTAAACTAAGGGATATATCTGTTCCAGCTGGTTTCTCCAATTTTGA
* 720 * 740 *
pAB123-PA : ..... : 750
MDV-B-PA : ..... : 750
AGGAATGAGGAGCTACATAGACAATATAGATCCTAAAGGAGCAATAGAGA
760 * 780 * 800
pAB123-PA : ..... : 800
MDV-B-PA : ..... : 800
GAAATCTAGCAAGGATGTCTCCCTTAGTATCAGTTACACCTAAAAAGTTG
* 820 * 840 *
pAB123-PA : ..... : 850
MDV-B-PA : ..... : 850
AAATGGGAGGACCTAAGACCAATAGGGCCTCACATTTACAACCATGAGCT
860 * 880 * 900
pAB123-PA : ..... : 900
MDV-B-PA : ..... : 900
ACCAGAAGTTCCATATAATGCCTTTCTTCTAATGTCTGATGAGTTGGGGC
* 920 * 940 *
pAB123-PA : ..... : 950
MDV-B-PA : ..... : 950
TGGCTAATATGACTGAAGGGAAGTCCAAGAAACCGAAGACCTTAGCCAAA
960 * 980 * 1000
pAB123-PA : ..... : 1000
MDV-B-PA : ..... : 1000
GAATGTCTAGAAAAGTACTCAACACTACGGGATCAAACTGACCCAATATT
* 1020 * 1040 *
pAB123-PA : ..... : 1050
MDV-B-PA : ..... : 1050
AATAATGAAAAGCGAAAAAGCTAACGAAAACTTCTTATGGAAGCTGTGGA
1060 * 1080 * 1100
pAB123-PA : ..... : 1100
MDV-B-PA : ..... : 1100
GGGACTGTGTAAATACAATAAGTAATGAGGAAACAAGTAACGAATTACAG

```
                    *      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
            AATCTATTGAGCACTCTGACAAGTAAAAGGGCCCTGGATCTACCAGAAAT

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

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

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

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

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

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

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

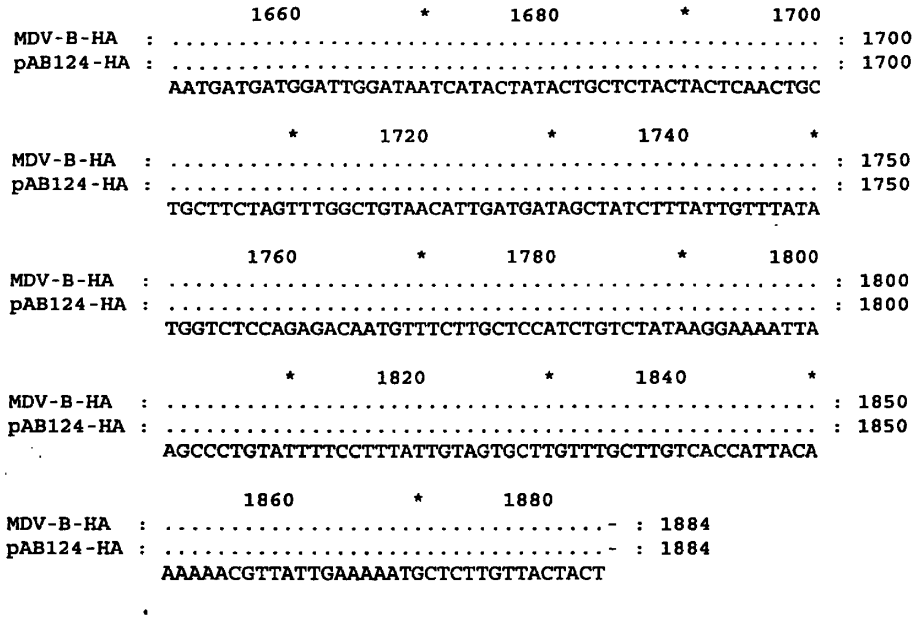
```
                    1660        *       1680        *       1700
pAB123-PA : .................................................. : 1700
MDV-B-PA  : .................................................. : 1700
            TTGGCTCCTTATTTGTGAGTGGAAGGGAAAAATCTGTGTACCTATATTGC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
                    *      2220         *      2240         *
pAB123-PA : ................................................ : 2250
MDV-B-PA  : ................................................ : 2250
            GGATGAATGAAAGAAGGGCATAGCGCTCAATTTGGTACTATTTTGTTCAT

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


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


HA
MDV-B-HA
pAB124-HA
AGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGT
ACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAA
CATCGTCAAACTCACCCCATGTGGTCAAAACTGCTACTCAAGGGGAAGTC
AACGTGACTGGTGTGATACCACTGACAACAACACCTACCAAATCTCATTT
TGCAAATCTCAAAGGAACACAGACCAGAGGGAAACTATGCCCAAACTGTC
TCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAGTGTATGGGG
ACCATACCTTCGGCAAAAGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTAC
ATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGACAGCTAC
CCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAGCCCGTAACGTT
ATCAACGCAGAAACGGCACCAGGAGGACCCTACATAGTTGGAACCTCAGG
ATCTTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAAGGATTCTTCGCAACAATGGCTT

```
MDV-B-HA  : ..................................................  :  600
pAB124-HA : ..................................................  :  600
            GGGCTGTCCCAAAAAACAACAAAACCAAAACAGCAACGAACCCATTAACA

                     *       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
            CGAAGCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTAACCACACATTAT

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

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

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

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

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

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

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

```
                        *       1120         *       1140         *
MDV-B-HA   : .................................................. : 1150
pAB124-HA  : .................................................. : 1150
             AAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTGG

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

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

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

                        *       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
             AAGATGAGCATCTCTTGGCACTTGAAAGAAAACTGAAGAAAATGCTGGGC

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

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

                        *       1620         *       1640         *
MDV-B-HA   : .................................................. : 1650
pAB124-HA  : .................................................. : 1650
             AATTTTCTCTTCCCACTTTTGATTCACTAAATATTACTGCTGCATCTTTA
```


1660 * 1680 * 1700
MDV-B-HA : ..... : 1700
pAB124-HA : ..... : 1700
AATGATGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTCTACTACTCAACTGC
* 1720 * 1740 *
MDV-B-HA : ..... : 1750
pAB124-HA : ..... : 1750
TGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTATTGTTTATA
1760 * 1780 * 1800
MDV-B-HA : ..... : 1800
pAB124-HA : ..... : 1800
TGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAGGAAAATTA
* 1820 * 1840 *
MDV-B-HA : ..... : 1850
pAB124-HA : ..... : 1850
AGCCCTGTATTTTCCTTTATTGTAGTGCTTGTTTGCTTGTCACCATTACA
1860 * 1880
MDV-B-HA : .....- : 1884
pAB124-HA : .....- : 1884
AAAAACGTTATTGAAAAATGCTCTTGTTACTACT

NP

```
                    10        20        30        40        50
pAB125-NP : ..................................................  :   50
MDV-B-NP  : ..................................................  :   50
            AGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGTGAACTTCAAGTACCAACAAAAACTGA

                    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
            AATCATCAAACCAGCAACCCTTGCCCCACCAAGCAACAAACGAACCCGAA

                   210       220       230       240       250
pAB125-NP : ..................................................  :  250
MDV-B-NP  : ..................................................  :  250
            ACCCATCCCCGGAAAGGGCAGCCACAAGCAGTGAAGCTGATGTCGGAAGG

                   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
            GAAAGAATTCTATTGGCTGCTACTGATGACAAGAAAACTGAATTCCAAAA

                   460       470       480       490       500
pAB125-NP : ..................................................  :  500
MDV-B-NP  : ..................................................  :  500
            GAAAAAGAATGCCAGAGATGTCAAAGAAGGGAAAGAAGAAATAGACCACA

                   510       520       530       540       550
pAB125-NP : ..................................................  :  550
MDV-B-NP  : ..................................................  :  550
            ACAAAACAGGAGGCACCTTTTACAAGATGGTAAGAGATGATAAAACCATC

                   560       570       580       590       600
```

```
pAB125-NP  : ..................................................  :  600
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
             TGATTGGGCATTCACAGATGAACGATGTCTGTTTCCAAAGATCAAAGGCA

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

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

                    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
             TCTGAATCTGAAAAACAAGTGCTCTGCGCCCCAACAAAAGGCTCTAGTTG

                    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
             AGTGGTGCTTCCCATAAGCATTTATGCCAAAATACCTCAACTAGGGTTCA
```

```
                    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
            ATCACAATTATTCTTCATGTCTTGCTTCGGAGCTGCCTATGAAGACCTAA

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

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

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

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

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

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

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

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

```
                    1660      1670      1680      1690      1700
pAB125-NP : ................................................ : 1700
MDV-B-NP  : ................................................ : 1700
            CAATCCCATTGAGATTCCAATTAAGCAGACCATCCCCAATTTCTTCTTTG

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

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

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

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

NA

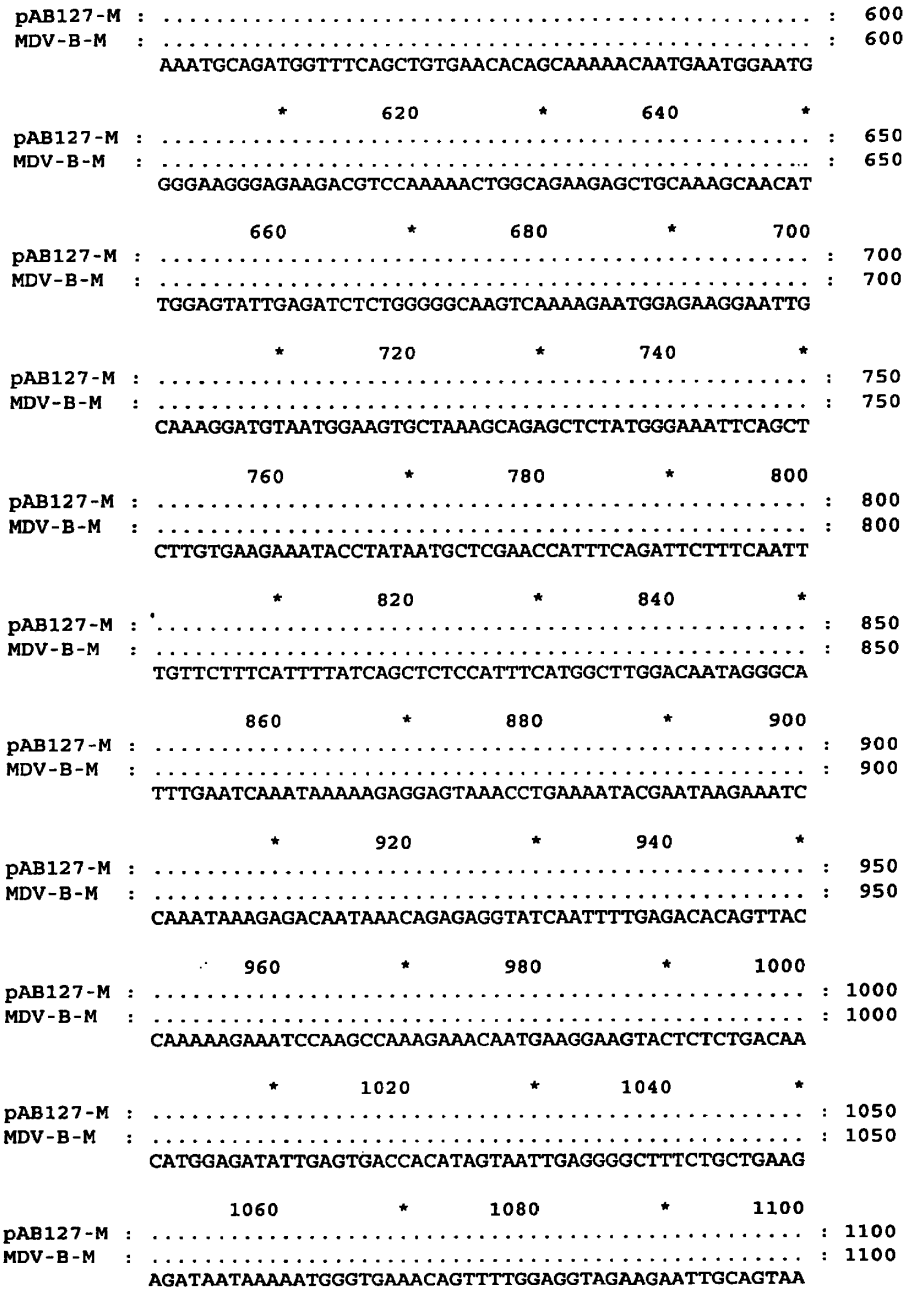
```
                      *        20         *        40         *
pAB126-NA : .................................................. :   50
MDV-B-NA  : .................................................. :   50
            AGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCAAAACTGAAGCAAATAGGCCAAAAATGA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

                      *       520         *       540         *
pAB126-NA : .................................................. :  550
MDV-B-NA  : .................................................. :  550
            AGAAACAAGCTGAGGCATCTGATTTCAGTCAAATTAGGCAAAATCCCAAC
```

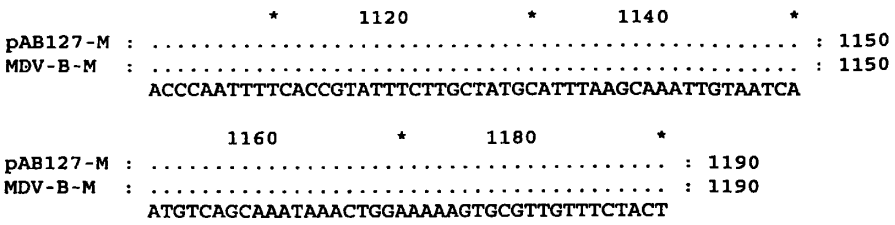
```
                     560         *       580         *       600
pAB126-NA : .................................................. :  600
MDV-B-NA  : .................................................. :  600
            TGTAGAAAACTCCATTTTCCACATGGCAGCTTGGAGTGGGTCCGCATGCC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

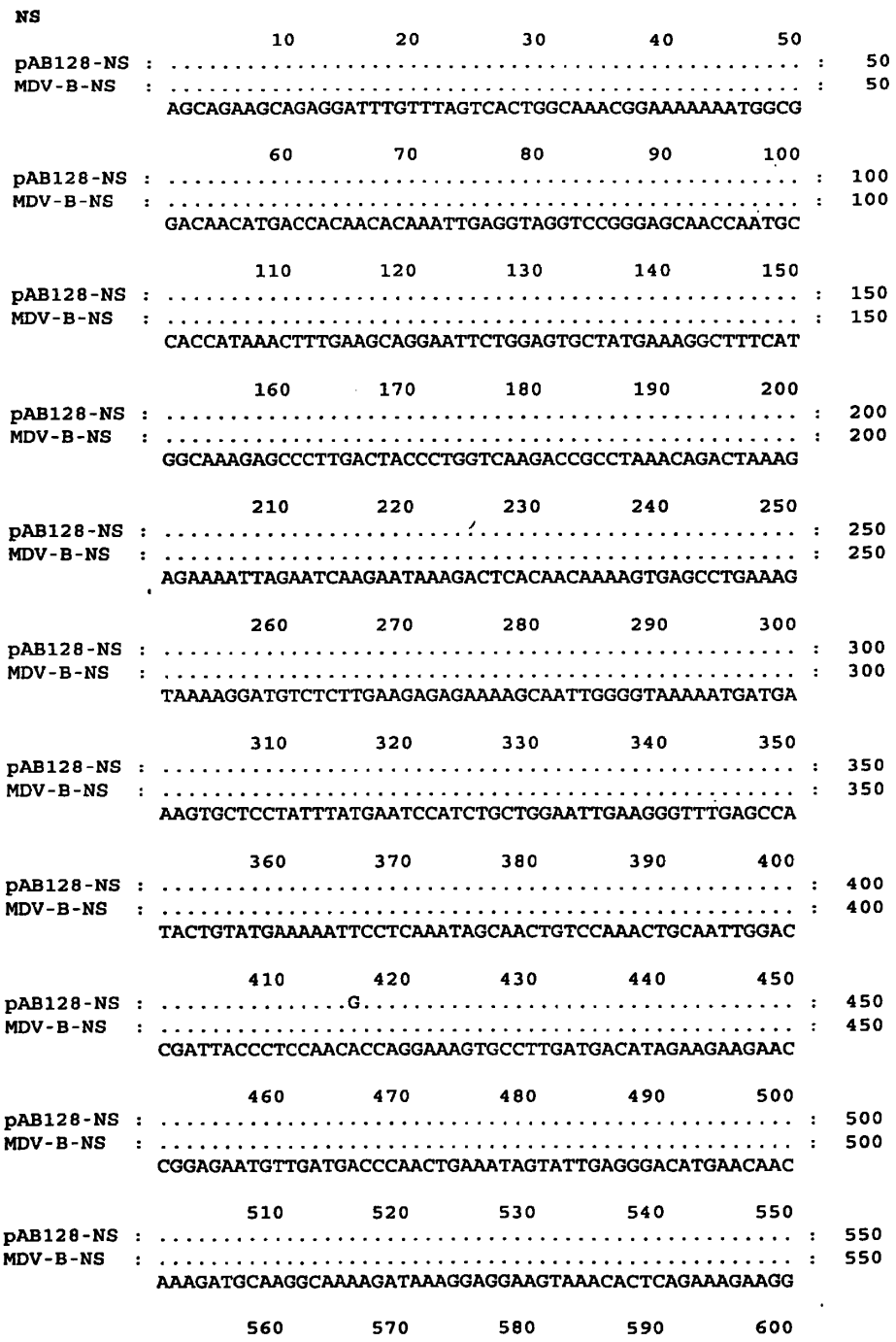
```
                    *      1120         *      1140         *
pAB126-NA : ................................................ : 1150
MDV-B-NA  : ................................................ : 1150
            GGAGGATTTGTCCATCAAAGAATGGCATCTAAGATTGGAAGATGGTACTC

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

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

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

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

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

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

M

```
                  *        20         *        40         *
pAB127-M : .................................................. :   50
MDV-B-M  : .................................................. :   50
           AGCAGAAGCACGCACTTTCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

                560         *       580         *       600
```


pAB127-M : ..... : 600
MDV-B-M : ..... : 600
AAATGCAGATGGTTTCAGCTGTGAACACAGCAAAAACAATGAATGGAATG
* 620 * 640 *
pAB127-M : ..... : 650
MDV-B-M : ..... : 650
GGGAAGGGAGAAGACGTCCAAAAACTGGCAGAAGAGCTGCAAAGCAACAT
660 * 680 * 700
pAB127-M : ..... : 700
MDV-B-M : ..... : 700
TGGAGTATTGAGATCTCTGGGGGCAAGTCAAAAGAATGGAGAAGGAATTG
* 720 * 740 *
pAB127-M : ..... : 750
MDV-B-M : ..... : 750
CAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAAATTCAGCT
760 * 780 * 800
pAB127-M : ..... : 800
MDV-B-M : ..... : 800
CTTGTGAAGAAATACCTATAATGCTCGAACCATTTCAGATTCTTTCAATT
* 820 * 840 *
pAB127-M : ..... : 850
MDV-B-M : ..... : 850
TGTTCTTTCATTTTATCAGCTCTCCATTTCATGGCTTGGACAATAGGGCA
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
CAAAAAGAAATCCAAGCCAAAGAAACAATGAAGGAAGTACTCTCTGACAA
* 1020 * 1040 *
pAB127-M : ..... : 1050
MDV-B-M : ..... : 1050
CATGGAGATATTGAGTGACCACATAGTAATTGAGGGGCTTTCTGCTGAAG
1060 * 1080 * 1100
pAB127-M : ..... : 1100
MDV-B-M : ..... : 1100
AGATAATAAAAATGGGTGAAACAGTTTTGGAGGTAGAAGAATTGCAGTAA


* 1120 * 1140 *
pAB127-M : ..... : 1150
MDV-B-M : ..... : 1150
ACCCAATTTTCACCGTATTTCTTGCTATGCATTTAAGCAAATTGTAATCA
1160 * 1180 *
pAB127-M : ..... : 1190
MDV-B-M : ..... : 1190
ATGTCAGCAAATAAACTGGAAAAAGTGCGTTGTTTCTACT


NS
10 20 30 40 50
pAB128-NS : ..... : 50
MDV-B-NS : ..... : 50
AGCAGAAGCAGAGGATTTGTTTAGTCACTGGCAAACGGAAAAAAATGGCG
60 70 80 90 100
pAB128-NS : ..... : 100
MDV-B-NS : ..... : 100
GACAACATGACCACAACACAAATTGAGGTAGGTCCGGGAGCAACCAATGC
110 120 130 140 150
pAB128-NS : ..... : 150
MDV-B-NS : ..... : 150
CACCATAAACTTTGAAGCAGGAATTCTGGAGTGCTATGAAAGGCTTTCAT
160 170 180 190 200
pAB128-NS : ..... : 200
MDV-B-NS : ..... : 200
GGCAAAGAGCCCTTGACTACCCTGGTCAAGACCGCCTAAACAGACTAAAG
210 220 230 240 250
pAB128-NS : ..... : 250
MDV-B-NS : ..... : 250
AGAAAATTAGAATCAAGAATAAAGACTCACAACAAAAGTGAGCCTGAAAG
260 270 280 290 300
pAB128-NS : ..... : 300
MDV-B-NS : ..... : 300
TAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAGCAATTGGGGTAAAAATGATGA
310 320 330 340 350
pAB128-NS : ..... : 350
MDV-B-NS : ..... : 350
AAGTGCTCCTATTTATGAATCCATCTGCTGGAATTGAAGGGTTTGAGCCA
360 370 380 390 400
pAB128-NS : ..... : 400
MDV-B-NS : ..... : 400
TACTGTATGAAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAAACTGCAATTGGAC
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
CGGAGAATGTTGATGACCCAACTGAAATAGTATTGAGGGACATGAACAAC
510 520 530 540 550
pAB128-NS : ..... : 550
MDV-B-NS : ..... : 550
AAAGATGCAAGGCAAAAGATAAAGGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGG
560 570 580 590 600

```
pAB128-NS : ..................................................... :  600
MDV-B-NS  : ..................................................... :  600
            GAAGTTCCGTTTGACAATAAAAAGGGATATACGTAATGTGTTGTCCTTGA

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

                    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
            TGCTAAACTTGTTGCTACTGATGATCTTACAGTGGAGGATGAAGAAGATG

                    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
            AAGCCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTGGGAGTCTTATCCCAATTTGG

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

                    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
            TATCATTATTGGAAACATTGTATGAAATGAAGGATGTGGTTGAAGTGTAC

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

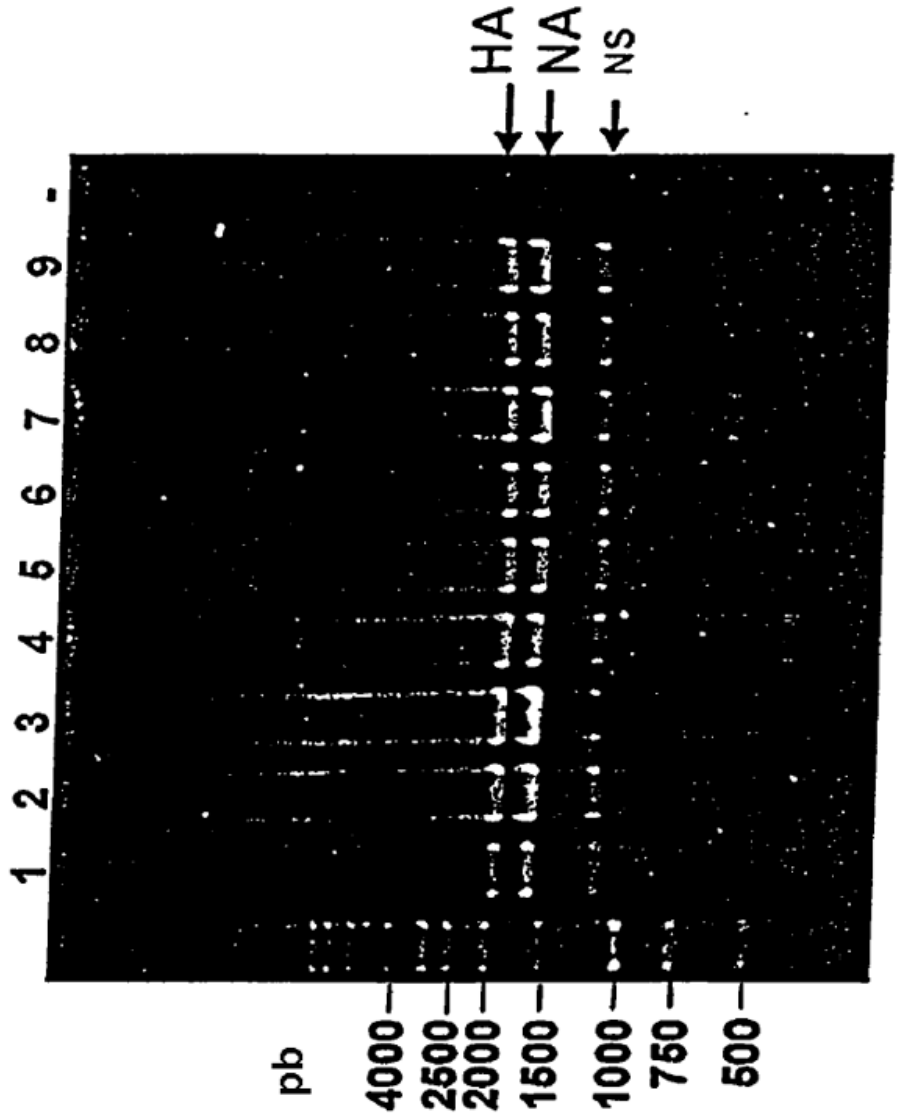


Figura 8

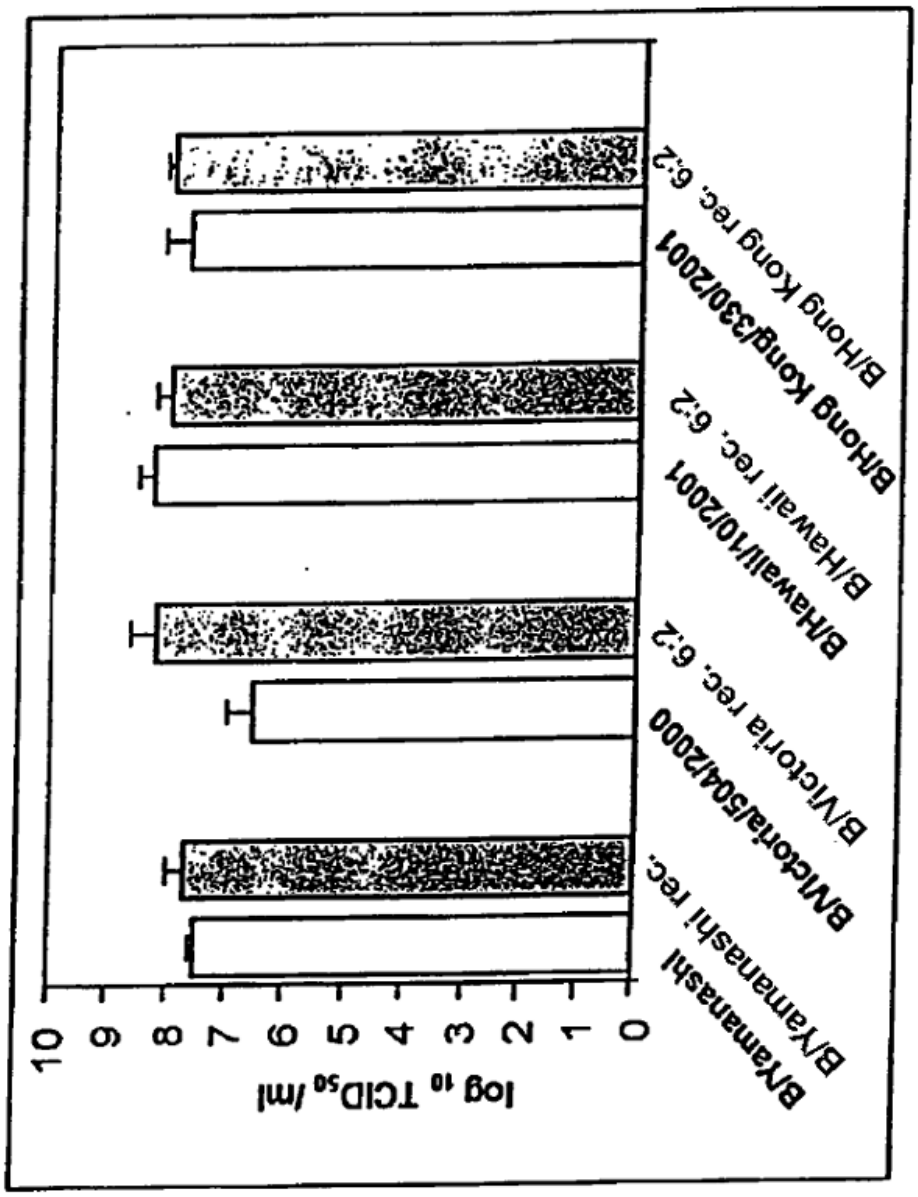

log 10 TCID50 /ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
B/Yamanashi
B/Yamanashi rec.
B/Victoria/504/2000
B/Victoria rec. 6:2
B/Hawaii/10/2001
B/Hawaii rec. 6:2
B/Hong Kong/330/2001
B/Hong Kong rec. 6:2

Figura 9

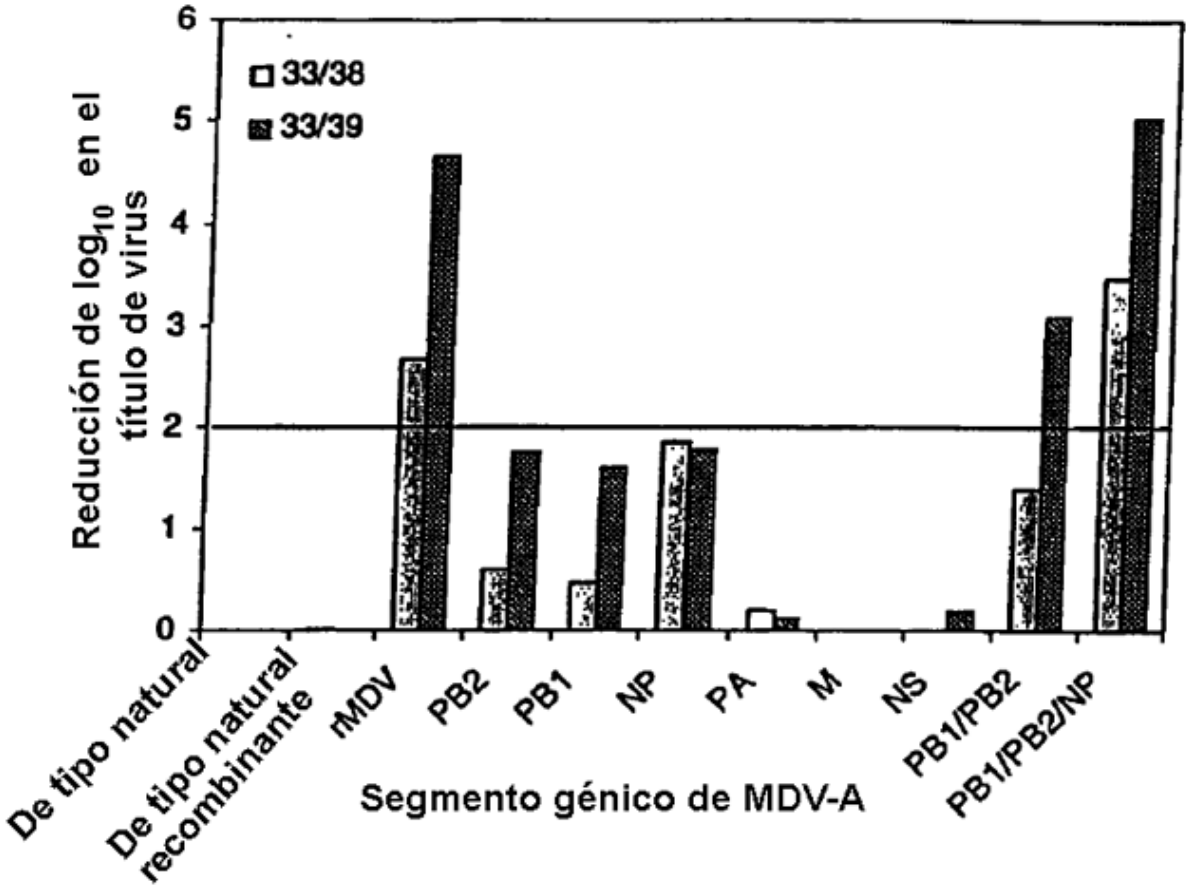
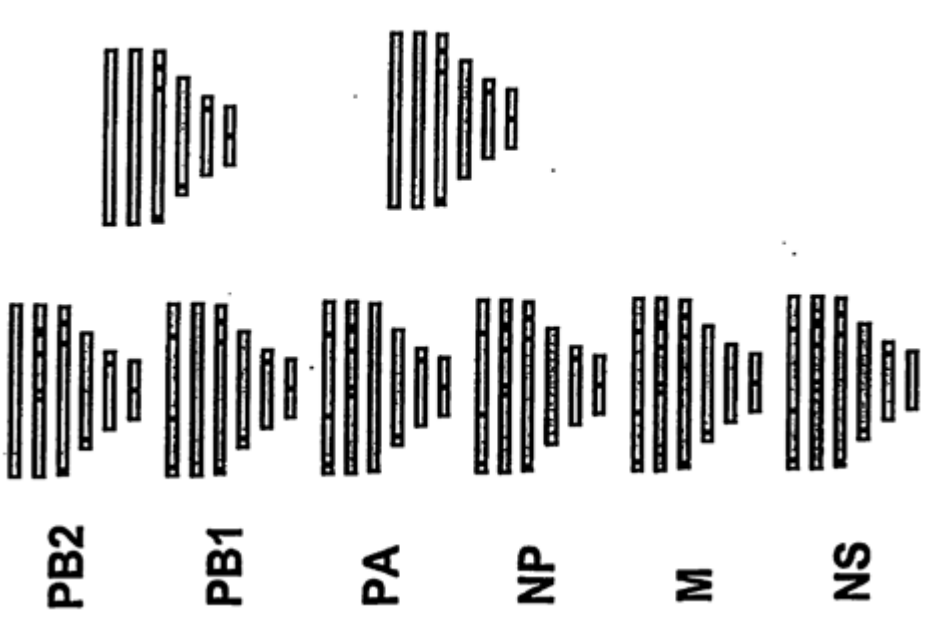

6
5
4
3
2
1
0
33/38
33/39
Reducción de log10 en el título de virus
De tipo natural
De tipo natural recombinante
rMDV
PB2
PB1
NP
PA
M
NS
PB1/PB2
PB1/PB2/NP
Segmento génico de MDV-A

Figura 10



	Log10 UFP/ml		
	33°C	33°C 38°C	33°C 39°C
PB2	9,2	0,6*	1,8*
PB1	9,1	0,6*	1,7*
NP	9,2	0,3*	1,4*
PB1+PB2	8,9	1,4*	3,1*
PB1+PB2+NP	9,0	3,4	>5,0

Figura 11

Figura 12

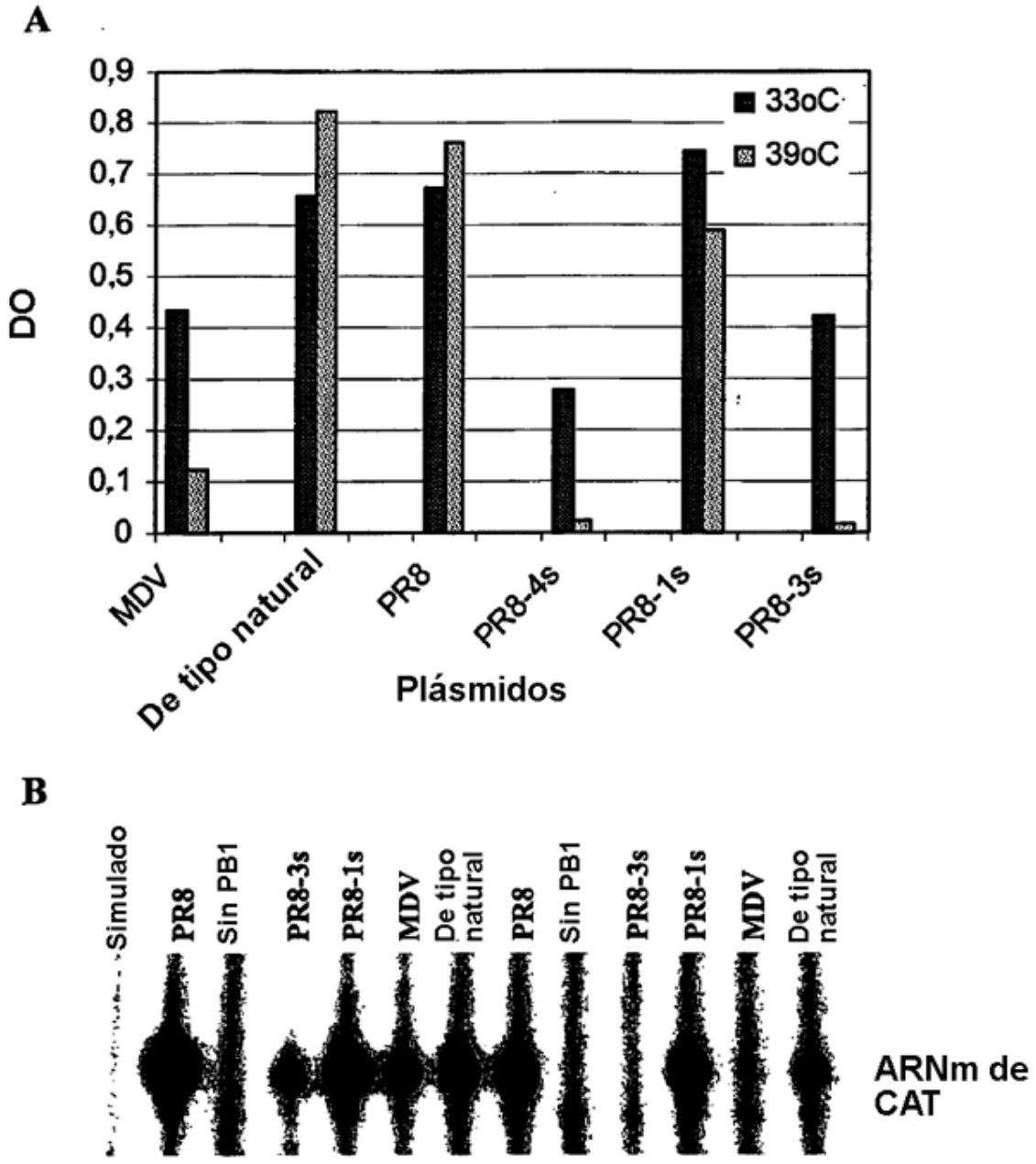
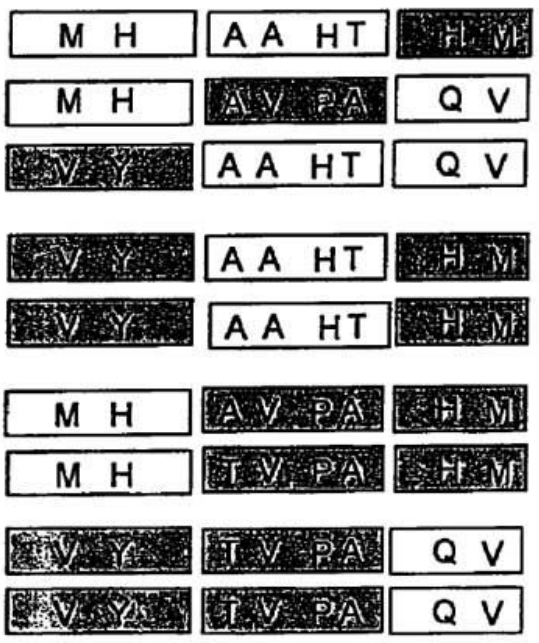

A
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
DO
33oC
39oC
MDV
De tipo natural
PR8
PR8-4s
PR8-1s
PR8-3s
Plásmidos
B
Simulado
PR8
Sin PB1
PR8-3s
PR8-1s
MDV
De tipo natural
PR8
Sin PB1
PR8-3s
PR8-1s
MDV
De tipo natural
ARNm de CAT

Fig. 13 Recombinantes de genes triples con residuos de tipo natural en proteínas PA, NP y M1

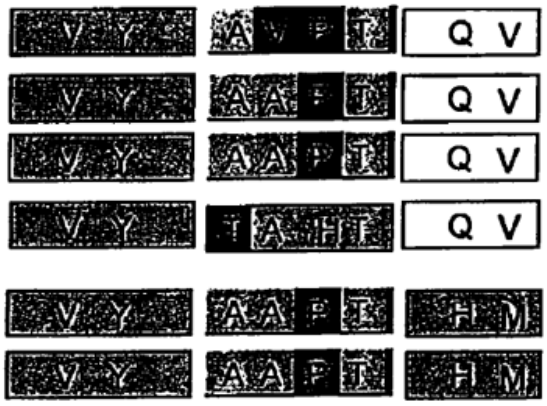
	MDCK log ufp/ml			PCK log $TCID_{50}$/ml		
	33°C	37°C	Δlog	33°C	37°C	Δlog
ts	6,6	< 2	> 3	5,6	3,0	2,6
no ts	7,6	6,6	1,0	8,1	7,4	0,7
no ts	7,6	7,1	0,5	7,4	6,5	0,9
no ts	8,1	7,1	1,0	7,7	6,5	1,2
ts	7,1	3,1	4,0	7,1	3,5	3,6
no ts	8,1	7,1	1,0	8,7	7,8	0,9
no ts	8,1	7,2	0,9	8,5	7,8	0,7

Fig. 14 Crecimiento de virus recombinantes de genes individuales y genes dobles



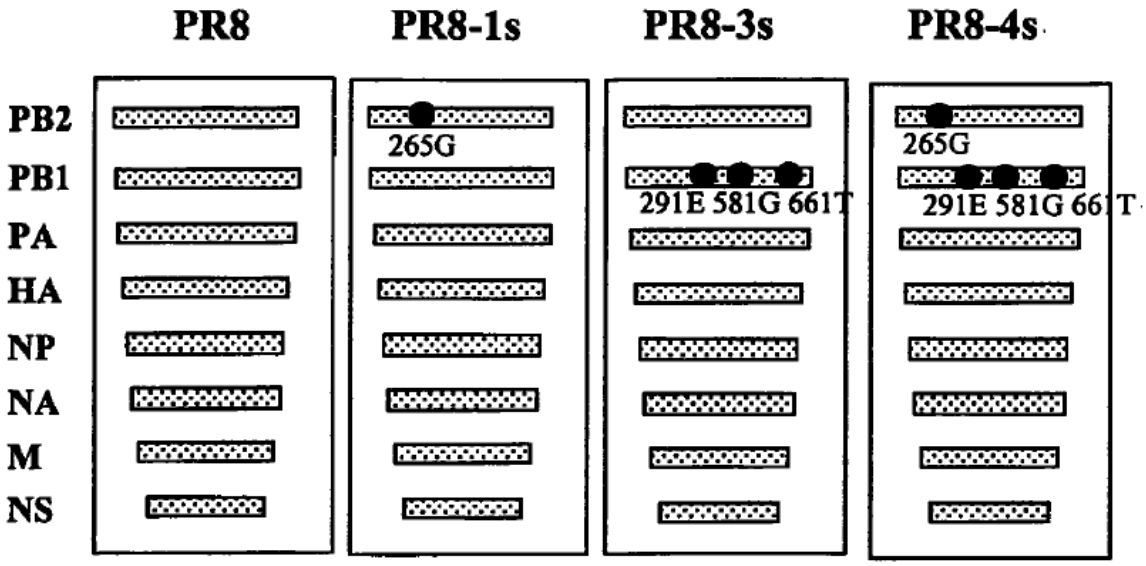
	MDCK log ufp/ml			PCK log $TCID_{50}$/ml		
	33°C	37°C	Δlog	33°C	37°C	Δlog
ts	7,1	3,2	3,9	6,2	3,3	2,9
ts	n.d.			5,8	2,9	2,9
ts	6,2	3,2	3,0	6,1	2,7	3,4
ts	7,4	4,4	3,0	7,5	3,4	4,1
ts	7,6	4,2	3,4	8,3	4,3	4,0
ts	7,4	4,4	3,0	8,1	4,3	3,8
ts	8,0	6,0	2,0	8,4	4,3	4,1
no ts	5,6	6,0	-0,4	6,4	4,5	1,9
no ts	6,6	5,8	0,8	6,8	4,8	2,0

Fig. 15 Residuos de aminoácido de la nucleoproteína necesaria para el fenotipo no ts



	MDCK log ufp/ml			PCK log $TCID_{50}$/ml		
	33°C	37°C	Δlog	33°C	37°C	Δlog
no ts	6,2	5,2	1,0	6,8	5,5	1,4
no ts	6,8	6,4	0,4	7,2	6,1	1,1
no ts	6,4	6,2	0,2	7,1	5,7	1,4
ts	6,6	4,4	2,2	6,6	3,4	3,2
no ts	7,4	6,8	0,6	8,3	7,0	1,3
no ts	n.d.			8,0	7,2	0,8

Figura 16


PR8
PR8-1s
PR8-3s
PR8-4s
PB2
PB1
PA
HA
NP
NA
M
NS
265G
265G
291E 581G 661T
291E 581G 661T

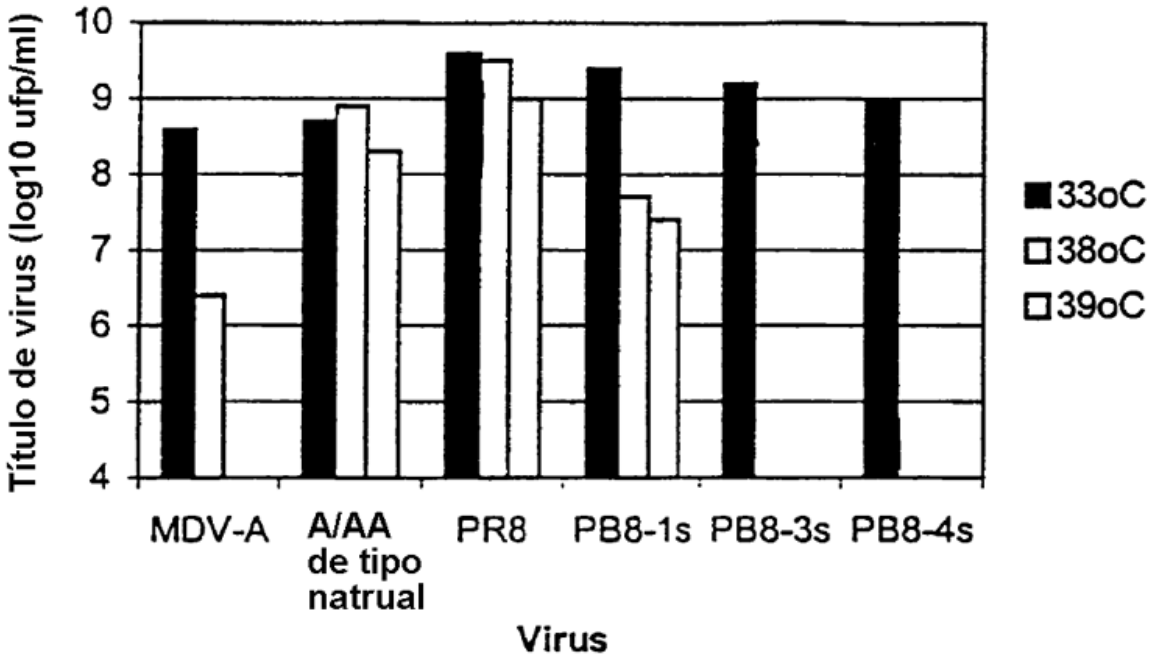

Título de virus (log10 ufp/ml)
10
9
8
7
6
5
4
MDV-A
A/AA de tipo natrual
PR8
PB8-1s
PB8-3s
PB8-4s
Virus
33oC
38oC
39oC

Figura 17

Figura 18

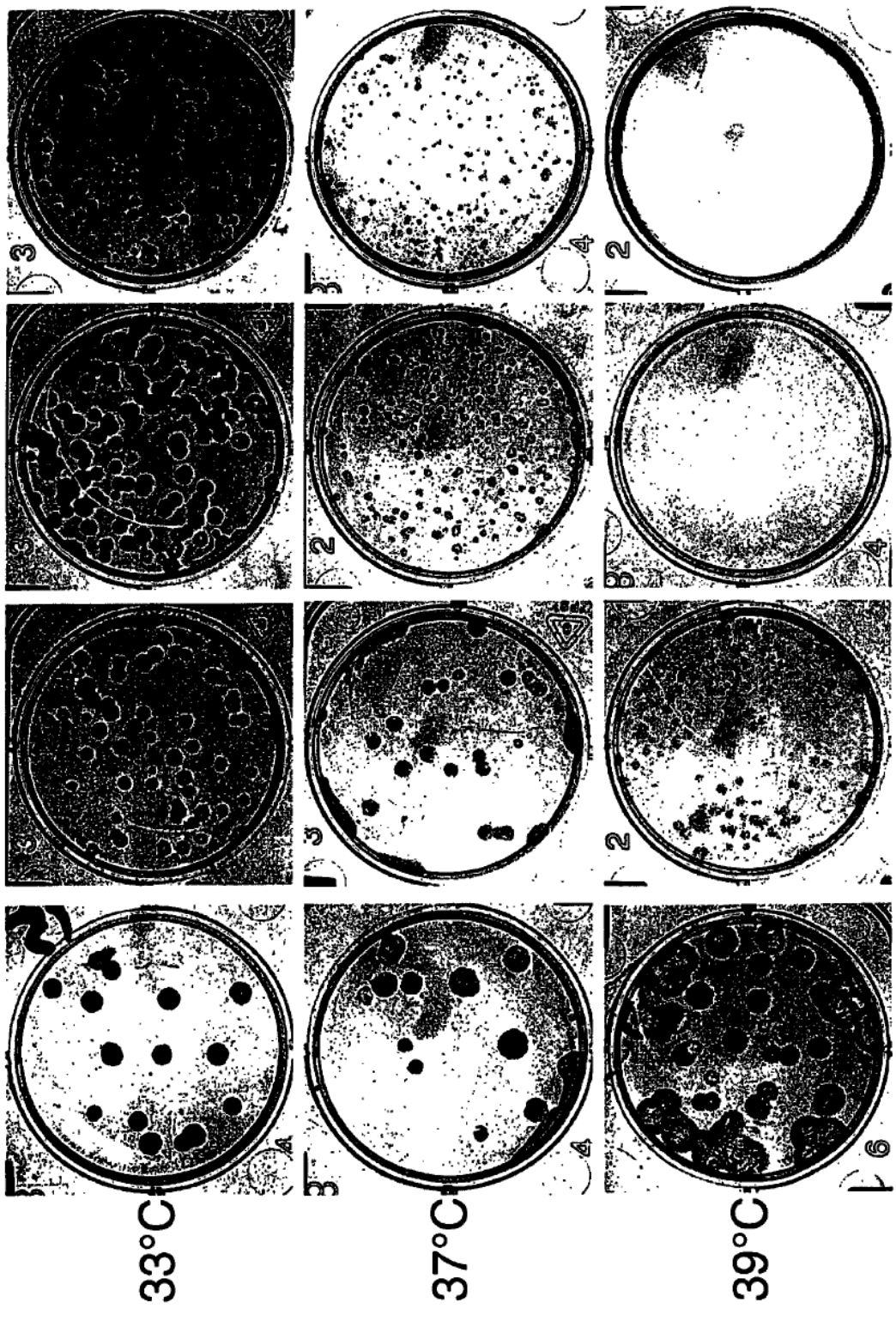


Figura 19

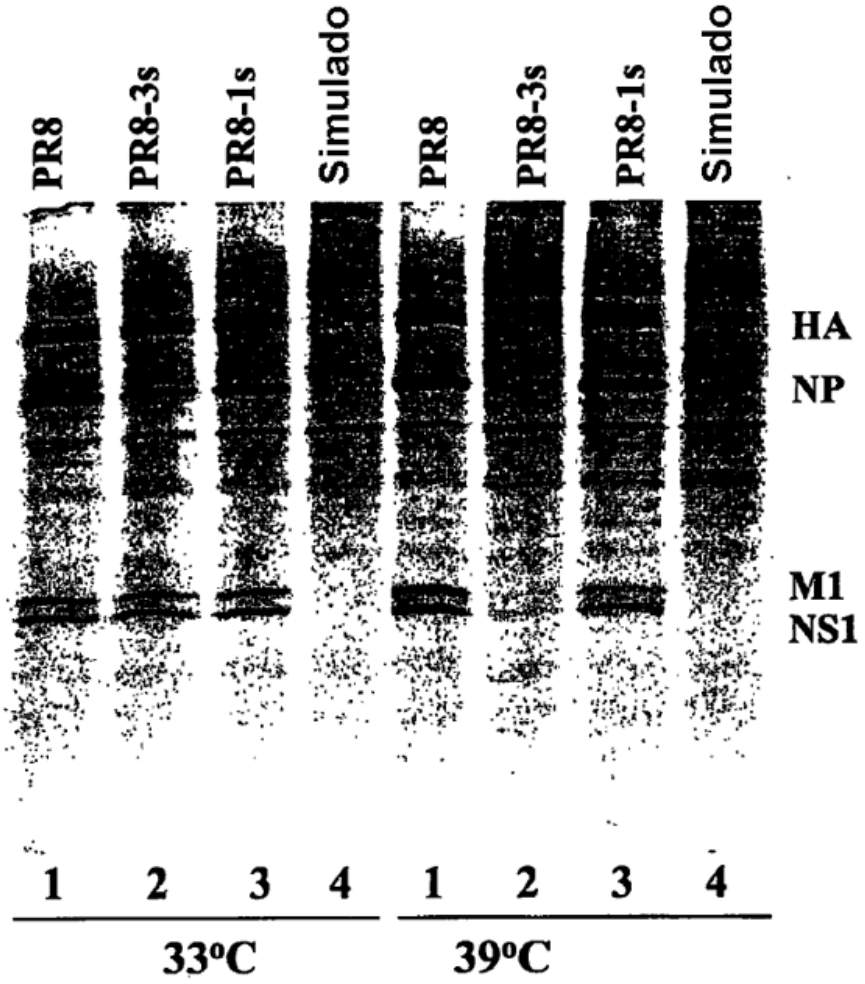

PR8
PR8-3s
PR8-1s
Simulado
PR8
PR8-3s
PR8-1s
Simulado
HA
NP
M1
NS1
1 2 3 4 1 2 3 4
33ºC
39ºC

Figura 20A

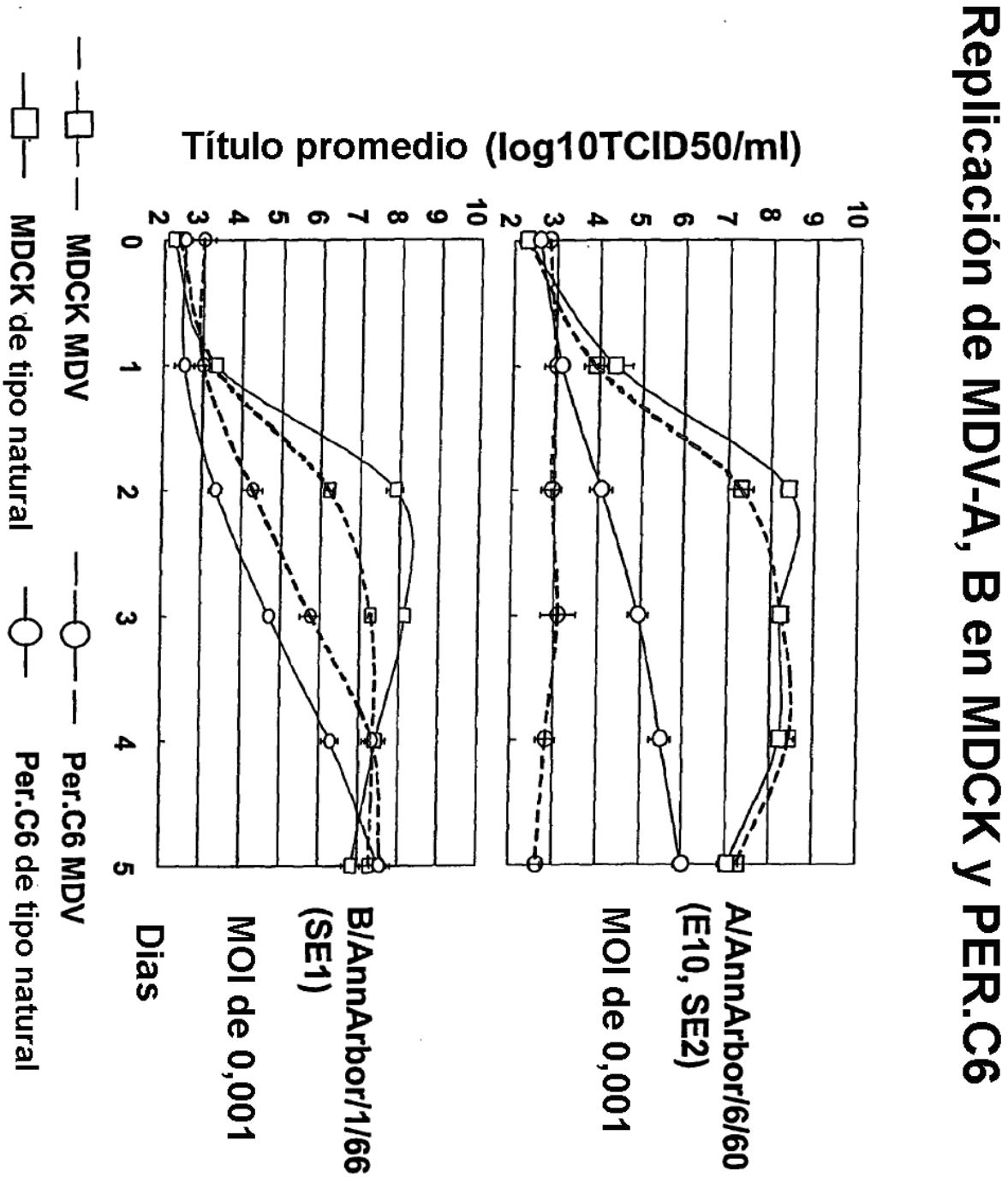
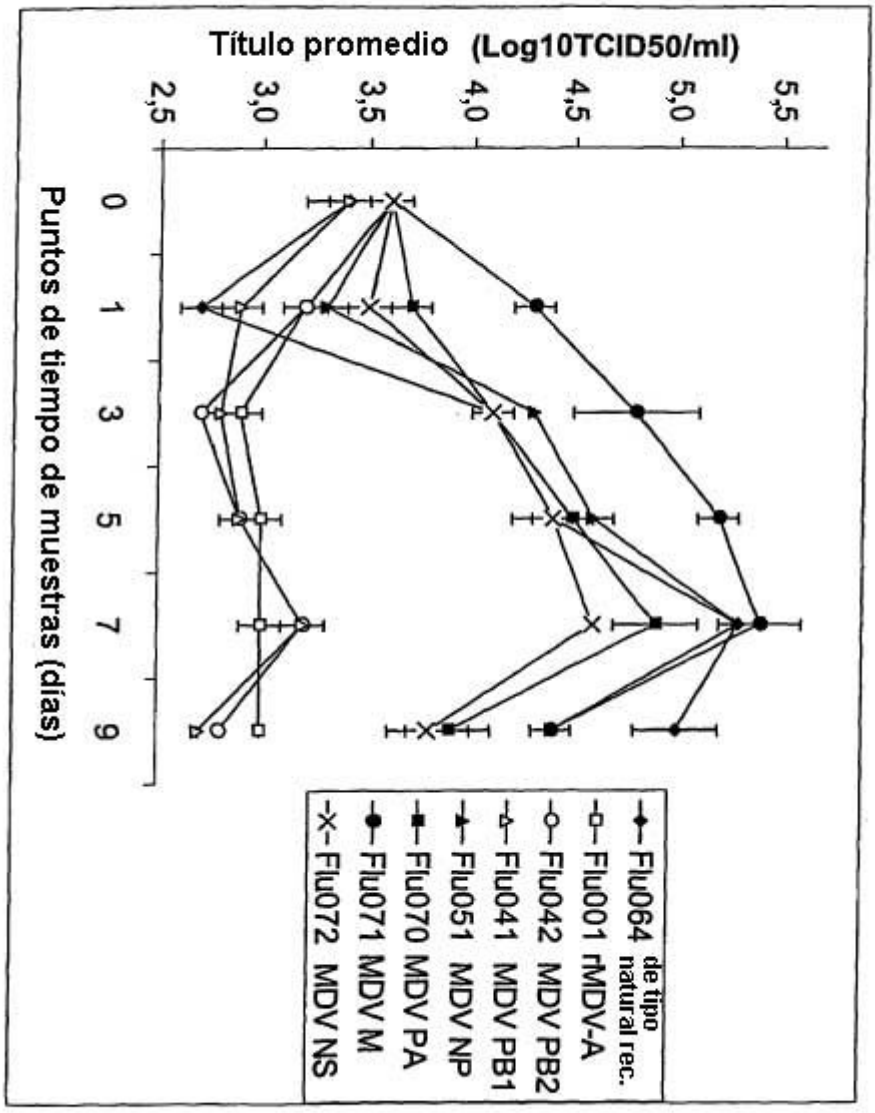

Replicación de MDV-A, B en MDCK y PER.C6
Título promedio (log10TCID50/ml)
A/AnnArbor/6/60 (E10, SE2)
MOI de 0,001
B/AnnArbor/1/66 (SE1)
MOI de 0,001
Dias
MDCK MDV
Per.C6 MDV
MDCK de tipo natural
Per.C6 de tipo natural

Figura 20B



Genes de MDV-A individuales en replicación en PER.C6