

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 551**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08840554 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2195420**

54 Título: **Procedimiento de producción del virus de la gripe**

30 Prioridad:

26.09.2007 FR 0757884

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

21.07.2015

73 Titular/es:

SANOFI PASTEUR (50.0%)
2, avenue Pont Pasteur
69367 Lyon Cedex 07, FR y
MERIAL LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

GERDIL, CATHERINE;
MOSTE, CATHERINE;
LEGASTELOIS, ISABELLE;
BUBLLOT, MICHEL y
LE GROS, FRANÇOIS-XAVIER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 541 551 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción del virus de la gripe

- 5 La invención tiene por objeto un procedimiento de producción del virus de la gripe utilizando unos huevos que provienen de gallinas vacunadas contra la gripe, así como a la utilización de tal procedimiento para la fabricación de una vacuna contra la gripe.

10 Actualmente, se conocen tres tipos de virus de la gripe (A, B y C), siendo los virus de tipo A responsables de afecciones animales y humanas, mientras que los virus de tipo B y C son sobre todo patógenos para el hombre. Los virus de tipo A están subdivididos en subtipos en función de la estructura antigénica de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA), que son las principales glicoproteínas de la envoltura viral. Se distinguen 16 subtipos de HA (H1 a H16) y 9 subtipos de NA (N1 a N9). El subtipo de un virus de tipo A está por lo tanto definido bajo el subtipo de HA y el subtipo de NA, que están presentes en la envoltura viral. Los pájaros salvajes constituyen el reservorio de
15 todos los subtipos de influenza A. Algunos subtipos de virus influenza de tipo A infectan de manera endémica o epidérmica (epidemias anuales) a los pájaros domésticos (diversos subtipos de los cuales H5N1 y H9N2), el caballo (H3N8 principalmente), el cerdo (H1N1, H3N2 y H1N2 principalmente) así como el ser humano (H1N1 y H3N2 principalmente). El perro, el gato y otras especies salvajes pueden también ocasionalmente ser infectados por algunos subtipos (H3N8 y H5N1 en el perro; H5N1 en el gato).

20 En el campo veterinario, las aves de corral, y más particularmente los polluelos, los pollos, las gallinas y los gallos, representan en número la población más elevada susceptible de ser afectada por el virus de la gripe. Las cepas de gripe aviar de subtipo H5 y H7 pueden ser de dos patotipos: un patotipo poco patógeno ("low path" o LP) y un patotipo altamente patógeno ("high path" o HP). Las cepas HP son responsables de la peste aviar y derivan de las
25 cepas LP H5 y H7 después de mutaciones/inserciones, en particular a nivel del sitio de escisión de la hemaglutinina (presencia de múltiples aminoácidos básicos). Hasta ahora, se recomiendan sobre todo unas medidas sanitarias estrictas y unos controles regulares en los criaderos para prevenir la gripe aviar, y en particular la infección por los subtipos H5 y H7.

30 En el hombre, se recomienda la vacunación contra las cepas virales circulantes de temporada responsables de epidemias más o menos importantes según los años. La mayoría de las vacunas actuales se producen utilizando unos huevos de gallina embrionados, siendo estos huevos infectados con tres cepas de virus gripal diferentes (dos cepas de virus gripal de tipo A que tienen el subtipo H3N2 y H1N1 y una cepa de virus de tipo B). Se utilizan unos
35 huevos embrionados de gallinas no vacunadas contra la gripe para evitar cualquier fenómeno de interferencia que podría perjudicar a la replicación del virus. En efecto, se sabe que los anticuerpos maternos son transferidos a los polluelos después de haber estado en el huevo y los protegen contra las infecciones microbianas durante los primeros días de la vida, pero, en contrapartida, son la causa de una inmunidad deficiente si se vacuna prematuramente a unos polluelos contra un agente microbiano mientras que existan todavía unos anticuerpos protectores maternos contra este agente. Stone H. *et al.* (1992, Avian Dis. 36: 1048-1051) han mostrado que se
40 podía inmunizar de manera pasiva unos polluelos recién nacidos contra la enfermedad de Newcastle inoculando yema de huevo que proviene de gallinas inmunizadas contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Sin embargo, si tras la administración de las yemas de huevo, se vacunan los polluelos con el virus NDV, se observa una disminución de la respuesta inmunitaria a la vacuna. Se sabe también, según los trabajos de Hamal *et al.* (2006, Poultry Science 65: 1364-1372), que los porcentajes de transferencia de los anticuerpos maternos protectores a los polluelos recién nacidos, en particular la transferencia de los anticuerpos dirigidos contra el virus NDV o el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), se sitúan entre el 30% y el 40% (índice del porcentaje de anticuerpos en el plasma de la gallina que circula en la sangre del polluelo de tres días), lo que indica que una gran cantidad de los anticuerpos maternos es secuestrada en el huevo. Esto se ha confirmado por los trabajos de Beck J.R *et al.* (2003, Avian Dis. 47:1196-1199), que muestran que todos los huevos contienen unos anticuerpos anti HA, aproximadamente 3 semanas después de haber vacunado unas gallinas con una cepa de virus gripal inactivada. Se
50 conoce finalmente, según los trabajos de Fontaine *et al.* (1963, Pathobiologie, 11/9: 611-613), que si se inocula un suero antigripal en huevos embrionados, se protegen los huevos contra la infección del virus gripal. Todas estas razones han llevado al experto en la técnica a considerar que si se utilizaban unos huevos de gallinas vacunadas contra la gripe, debido a la transferencia de los anticuerpos maternos dirigidos contra la gripe en los huevos, estos se volverían incapaces para la producción de virus gripales.

Desde el principio de los años 2000, la incidencia económica de la gripe aviar en los criaderos de aves domésticas no deja de crecer con la aparición de cepas de virus aviares altamente contagiosas y patógenas, diezmando
60 criaderos enteros de pollos o, en los casos menos dramáticos, deteniendo la puesta de huevos en las gallinas infectadas. El tipaje de HA de las cepas de virus altamente patógenas muestra que tienen casi todas el subtipo H5 o H7. Se teme ahora que las cepas de virus que tienen el subtipo H5 o H7 no se adapten al ser humano y puedan ser el origen de una verdadera pandemia de gripe en el hombre; casos graves de gripe humana, ciertamente aislados, que implican estos subtipos, ya han sido comunicados.

65 Frente al riesgo de que el suministro de huevos pueda no ser siempre asegurado para fabricar la vacuna antigripal, los nuevos métodos de producción de vacunas contra la gripe se orientan actualmente hacia la utilización de

sistemas de cultivo celular.

Resumen de la invención

5 A pesar de los nuevos modos de producción de las vacunas gripales, existe no obstante siempre una necesidad de poder producir, en cualquier circunstancia, en un tiempo reducido y en una cantidad muy grande el virus gripal para fabricar la vacuna contra la gripe. La presente invención responde a esta necesidad describiendo un procedimiento de producción del virus de la gripe basado, contra toda previsión, en la utilización de huevos que provienen de gallinas previamente vacunadas contra la gripe.

10 Un objetivo de la invención se refiere en efecto:

A un procedimiento de producción del virus de la gripe según el cual:

15 a. se administra a gallinas una vacuna contra la gripe,

b. se recogen los huevos de las gallinas vacunadas,

20 c. se activa el proceso de embriogénesis,

d. se infectan los huevos embrionados inoculando un virus de la gripe en la cavidad alantoica,

e. se incuban los huevos embrionados infectados en condiciones de temperatura y de humedad que permiten la replicación del virus, y

25 f. se recoge el líquido alantoico que contiene el virus.

De manera preferida, la vacuna protege las gallinas contra la gripe aviar.

30 Típicamente, la vacuna contra la gripe comprende en su composición la hemaglutinina de un virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica esta proteína. Según un aspecto, la composición de la vacuna contra la gripe contiene un virus gripal entero e inactivado.

35 Según otro aspecto, la composición de la vacuna contra la gripe contiene un producto derivado de un virus gripal entero.

Según también otro aspecto, la composición de la vacuna contiene también un adyuvante.

40 En otro aspecto, la composición de la vacuna contra la gripe contiene un virus gripal atenuado.

Según otra modalidad, la vacuna contra la gripe comprende un vector que comprende un gen que codifica para la hemaglutinina de un virus gripal.

45 De manera preferida, el vector es un poxvirus.

En un aspecto particular, el vector comprende también un gen que codifica para la neuraminidasa de un virus gripal.

Según otro aspecto, la composición de la vacuna contiene también un adyuvante.

50 Según un modo de realización del procedimiento según la invención, la hemaglutinina del virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas tienen unos subtipos diferentes.

55 Según otro modo de realización, la hemaglutinina del virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas tienen el mismo subtipo.

60 Según también otro modo de realización, la hemaglutinina del virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas son idénticos.

65 Según también otro modo de realización, el virus de la gripe contenido en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas es idéntico al virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos

embrionados de las gallinas vacunadas.

5 En un modo de realización particularmente preferido, la hemaglutinina el virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas tienen el subtipo H5, H6, H7 o H9.

10 En un modo de realización particularmente preferido, la hemaglutinina el virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína, contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas, y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas, tienen el subtipo H5, o H7.

15 En un aspecto particular, el procedimiento según la invención comprende una etapa suplementaria de purificación del virus.

En otro aspecto particular, el procedimiento según la invención comprende una etapa suplementaria de purificación del virus.

20 En otro aspecto particular, el procedimiento según la invención comprende una etapa suplementaria de inactivación del virus.

Tiene también por objeto la utilización de un procedimiento según la invención para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe.

25 En un aspecto particular, la utilización del procedimiento según la invención sirve para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe humana pandémica.

30 En otro aspecto particular, la utilización de un procedimiento según la invención sirve para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe humana epidémica.

En aún otro aspecto, la utilización de un procedimiento según la invención sirve para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe en los équidos, los suidos, los cánidos, los félidos, los mustélidos, y las especies aviares.

35 La invención tiene también por objeto la utilización de huevos de gallinas vacunadas contra la gripe para la producción de un virus gripal.

40 Según un aspecto preferido, la utilización de los huevos de gallinas vacunadas contra la gripe sirve para la fabricación de una vacuna contra la gripe.

Finalmente, según un último aspecto, la utilización de los huevos de gallinas vacunadas contra la gripe sirve para la producción de un virus gripal o para la fabricación de una vacuna contra la gripe, según la cual los huevos contienen unos anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina del virus de la gripe y de manera particular los huevos contienen unos anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina del virus de la gripe que tiene el subtipo H5, H6, H7 o H9.

45 Descripción detallada de la invención

50 Por "virus de la gripe o virus gripal" se designan tanto el virus gripal que proviene de una cepa salvaje, como el virus gripal que proviene de una cepa reclasificada que resulta de la redistribución de los segmentos genómicos de una o más cepas salvajes con una cepa "maestra" seleccionada por su fuerte potencial de crecimiento en el huevo. La cepa reclasificada adquiere unas características de la cepa "maestra" pero conserva menos las características de HA y de NA de la cepa salvaje, lo que significa que la identidad entre la secuencia proteica de HA y de NA de la cepa reclasificada y la secuencia proteica de HA u de NA de la cepa salvaje, determinada mediante un programa de alineación global, es de por lo menos el 95%, de manera preferida de por lo menos el 98%, de manera más preferida de por lo menos el 99%, y de manera aún más preferida del 100%. La cepa reclasificada se puede obtener por coinfección de una célula sensible con la cepa salvaje y la cepa "maestra" seguida de los medios apropiados para seleccionar la cepa reclasificada deseada. Puede también obtenerse mediante genética inversa a partir de los ácidos nucleicos de la cepa salvaje y de la cepa "maestra" y expresión en los sistemas de expresión multiplasmídicos como se describe en los documentos WO 01/83794, WO 03/091401 y en Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:9345-9350 (1999). En el caso de las cepas altamente patógenas, como las cepas H5 y H7, se podrá llevar a cabo una modificación del sitio de escisión que comprende múltiples aminoácidos básicos a fin de hacer la cepa reclasificada débilmente patógena.

65 Por comodidad de lenguaje, se utiliza indistintamente el término de cepa vacvínea o de virus vacvínea para designar el virus de la gripe que sirve para la fabricación de la vacuna contra la gripe; de la misma manera, se utiliza el término de cepa infectante o de virus infectante para designar el virus de la gripe que sirve para infectar el material

biológico (huevos, animales).

Por otro lado, se utiliza el término de huevos de gallinas vacunadas para designar unos huevos de gallinas fecundados que provienen de gallinas que se han vacunado previamente y puesto en contacto con gallos.

De manera general, la vacuna contra la gripe que sirve para la vacunación de las gallinas se puede fabricar a partir de cualquier cepa de virus de la gripe. La cepa vaccínea puede ser un virus de tipo A, pero también de tipo B o C. Cuando se trata de una cepa de virus de tipo A, el virus puede tener cualquier subtipo de HA y/o cualquier subtipo de NA. Puede tratarse, por ejemplo, de cepas virales que tienen el subtipo H1N1 o H3N2 actualmente responsables de la gripe humana de tipo A epidémica.

El interés en vacunar unas gallinas con un virus gripal es importante a partir del momento en el que la vacunación confiere una protección contra la gripe aviar.

La gripe aviar puede pasar desapercibida o caracterizarse por un conjunto de manifestaciones, frecuentemente de orden respiratorio y/o intestinal, de intensidad más o menos grande, alterando más o menos el estado general de las gallinas, que puede llegar a la muerte del animal cuando la cepa de virus es altamente patógena. La gripe aviar conlleva frecuentemente una disminución, incluso una desaparición, de la actividad de puesta de huevos. Las cepas de virus débilmente patógenas que pertenecen a los subtipos H6N2 o H9N2 o incluso H5 o H7 son frecuentemente responsables de las formas ligeras de gripe aviar, conllevando generalmente una bajada o una desaparición de la producción de huevos, pero ninguna mortalidad importante. Por el contrario, las cepas de virus altamente patógenas que pertenecen a los subtipos H5 y H7 (en particular, H5N1, H5N2, H5N9, H7N1, H7N4 o H7N7) son muy virulentas y causan una mortalidad muy importante en la crianza de gallinas.

El HA es un antígeno esencial en el desarrollo de una inmunidad protectora contra la gripe. La vacuna utilizada en el procedimiento según la invención comprende en su composición al menos el HA de uno de los virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína.

Por "gen" se entiende una secuencia nucleotídica que corresponde a una fase abierta de lectura y que codifica par una proteína. El gen, bajo la dependencia de las secuencias reguladoras de la expresión (promotor, potenciador, señal de poliadenilación, detención de la transcripción, etc.) se inserta en el ácido nucleico de un vector, en particular un plásmido o un virus, pudiendo estas secuencias reguladoras ser las que se asocian habitualmente a la fase abierta de lectura (secuencias endógenas) o provenir de un origen diferente (secuencias exógenas).

Puede tratarse de HA de una cepa de virus de la gripe humana, pero que no es patógena para las gallinas. De manera preferida, contiene una HA de interés, es decir una HA que tiene el mismo subtipo que la HA de una cepa viral que es responsable de una gripe aviar y contra la cual se busca inmunizar y proteger las gallinas. De manera preferida, el grado de identidad entre la secuencia proteica de HA presente en la vacuna y el de la cepa contra la cual se desea proteger las gallinas es de por lo menos el 80%, preferiblemente de menos el 90%, y de manera aún más preferida de por lo menos el 95%, determinado mediante un programa de alineación global (tal como el programa Blast).

Clásicamente, la vacuna que comprende HA está en forma de una composición que contiene un virus gripal entero inactivado, o un producto derivado del virus gripal entero inactivado.

Mediante "producto derivado del virus entero inactivado" se entiende una composición vaccínea inactivada (es decir no infecciosa) que se prepara a partir de una cepa de virus y que comprende al menos la HA de dicha cepa de virus. El producto derivado de una cepa de virus entero puede ser un virus fragmentado (o dividido) y en este caso se habla de vacuna "dividida". Otro producto derivado de una cepa de virus entero es la HA de esta cepa tal cual o asociada a la NA que se obtuvo utilizando unos procedimientos de extracción y de purificación, y en este caso se habla de vacuna "subunitaria". La HA puede también ser integrada secundariamente en un virusoma. La composición vaccínea que contiene el virus gripal entero inactivado, o un producto derivado del virus entero inactivado puede contener asimismo uno o varios adyuvantes o formulaciones adyuvantes. Como ejemplo de formulaciones adyuvantes no limitativas, se citan las emulsiones agua en aceite o aceite en agua, como la emulsión MF59[®] (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Edited by M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 página 183), las formulaciones a base de liposomas, unas formulaciones a base de MPL (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Edited by M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 pages 1186-187), de Avridina (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Edited by M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 página 148), de bromuro de dimetildioctadecilamonio (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 página 157), de *Corynebacterium parvum*, de saponina, de lisolecitina, de derivados plurónicos (Hunter H. *et al.* 1991, vaccine, 9: 250-256) (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Edited by M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 página 200 y páginas 297-311)), de sales de amonio o de combinaciones de estas (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 páginas 249-276). De manera preferida, las emulsiones agua en aceite están compuestas de aceite de parafina, de un tensioactivo hidrófilo tal como el polisorbato 80, polisorbato 85 y de un tensioactivo lipófilo tal como el oleato de sorbitán, el trioleato de sorbitán. Unos ejemplos de emulsiones utilizadas

en la gallina son descritos en Stone *et al.* (1983, Avian Dis., 27: 688-697; 1993, Avian Dis., 37: 399-405; 1991, Avian Dis., 35: 8-16); en M. Brugh *et al.* (1983, Am. J. Vet. Res., 44: 72-75); en Woodward L. *et al.* (1985, Vaccine, 3: 137-144); en (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach Editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995 página 219). La cepa vaccínea proviene generalmente de una cepa salvaje que se ha aislado en la gallina, la pava, el pato, la oca, u otra especie aviar, siendo esta cepa generalmente poco patógena para la gallina. Como ejemplo de muestras (cepas salvajes) que sirven para la preparación de vacunas para proteger las gallinas contra la gripe aviar de subtipo H5 o H7, se citan las muestras A/turkey/Wisconsin/68 o A/chicken/Italy/22A/98, que son unas cepas virales que tienen el subtipo H5N9, las muestras A/turkey/England/N-28/73, A/chicken/Mexico/238/94/CPA, A/chicken/Mexico/232/94/CPA o A/duck/Potsdam/1402/86 que son unas cepas virales que tienen el subtipo H5N2, la muestra A/goose/Guandong/1/1996 que es una cepa viral HP que tiene el subtipo H5N1, las muestras A/chicken/Italy/AG-473/1999, o A/chicken/Italy/1067/1999 que son unas cepas virales que tienen el subtipo H7N1, la muestra A/chicken/Pakistan/95 que es una cepa HP que tiene el subtipo H7N3, la muestra A/duck/Postdam/15/80 que es una cepa viral que tiene el subtipo H7N7. Como ejemplo de cepas virales H9N2 utilizadas para proteger las aves domésticas contra la gripe aviar de subtipo H9 se citan las muestras A/chicken/Iran/AV12221/98 y A/chicken/UAE/415/99. Como ejemplo de cepa viral H6N2 utilizada para proteger las gallinas contra la gripe aviar de subtipo H6, se cita la muestra A/turkey/Italy/90). Las cepas vaccíneas que sirven para la fabricación de vacunas pueden también ser unos reclasificantes de cepas salvajes obtenidas en particular por genética inversa. Se cita en particular la cepa vaccínea Re-1, que es una cepa reclasificada obtenida por recombinación inversa de la cepa salvaje H5N1 A/goose/Guandong/1/96 con la cepa "maestra" A/PR/8/34 que se reproduce muy bien en los huevos. (Tian *et al.*, 2005, Virology, 341: 153-162). Otro ejemplo de cepa reclasificada obtenida por genética inversa es la cepa H5N3 obtenida por reclasificación genética y que contiene la hemaglutinina H5 de la cepa H5N1 A/chicken/Vietnam/C58/04, la neuraminidasa de la cepa H2N3 A/duck/Germany/1215/73, y los genes internos de la cepa "maestra" A/PR/8/34 (Webster *et al.*, 2006, Virology, 351: 301-311).

Las vacunas contra la gripe aviar contienen habitualmente el virus de una sola cepa de virus gripal inactivada (vacunas monovalentes) pero en algunos casos, puede ser ventajoso utilizar unas vacunas multivalentes que contienen varias cepas de virus gripal inactivadas. Se trata en particular de una vacuna a base de cepas H7N1 y H5N9 que es una emulsión agua en aceite que contiene las cepas vaccíneas inactivadas A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) y A/chicken/Italy/1067/1999 (H7N1). Las vacunas inactivadas pueden también contener unas valencias diferentes, por ejemplo, una vacuna bivalente contra la gripe aviar H9N2 y la enfermedad de Newcastle. Las vacunas inactivadas son generalmente administradas por vía parenteral (intramuscular o subcutánea). Se pueden también administrar en forma de espray como en el caso de la vacuna Aerovac AI comercializada por Investigación Aplicada que contiene la cepa vaccínea inactivada A/chicken/Mexico/232/94/CPA (H5N2). El esquema de inmunización comprende habitualmente una o dos administraciones de 2 a 4 semanas de intervalo. La dosis vaccínea administrada varía en función de la edad de los animales, pero contiene habitualmente el equivalente de 10 a 200 µl de líquido alantoidiano que titula de 10^9 a 10^{10} EID₅₀/ml antes de la desactivación. La dosis vaccínea está habitualmente administrada en un volumen que varía de entre 0,05 y 1 ml. La preparación de vacunas inactivadas contra la gripe aviar está descrita por Stone H. (1987, Avian Dis. 31: 483-490). En la medida en la que el subtipo de HA de la cepa vaccínea es el mismo que el de la HA de la cepa responsable de la gripe aviar patógena, y en base a un grado de identidad entre las secuencias proteicas de las dos HA del orden del 80 al 90% determinado mediante un programa de alineación global, el índice de protección obtenido contra los síntomas clínicos de la gripe aviar (morbidez y mortalidad) es generalmente de más del 80% y preferiblemente más del 90%. Esto se confirma por los trabajos de Bublot M. *et al.*, 2007, Avian Dis. 51: 332-337, que muestran que un grado de identidad del orden del 80 al 90% entre la secuencia proteica de HA de la cepa vaccínea y la secuencia proteica de HA de la cepa infectante patógena basta para obtener este índice de protección. Además, no es necesario que el subtipo de la NA de la cepa vaccínea sea el mismo que el de la NA de la cepa infectante patógena para obtener este índice de protección. Por otro lado, las vacunas contra la gripe aviar disminuyen fuertemente la excreción del virus en los animales vacunados y probados con un virus infeccioso puesto en evidencia por una disminución muy clara de la carga viral observada en extracciones orales y cloacales (Bublot M. *et al.*, 2007, Avian Dis. 51: 332-337). Otro efecto beneficioso de las vacunas contra la gripe aviar es disminuir la difusión del virus en los criaderos de gallinas.

Según otro modo de realización del procedimiento según la invención, la vacuna que sirve para la inmunización de las gallinas está en forma de una composición que contiene una cepa de virus gripal atenuada. La cepa vaccínea está generalmente en forma de un reclasificante que se ha seleccionado tras una reclasificación genética entre una cepa salvaje que expresa HA de interés y secundariamente la NA de interés, y una cepa "maestra" que se ha adaptado al frío y/o que es sensible a la temperatura. El reclasificante es una cepa viral que expresa a su superficie la HA y accesorariamente la NA de interés, conservando al mismo tiempo las características fenotípicas de la cepa "maestra" que se refiere a su capacidad para replicarse únicamente en unos límites reducidos de temperatura, inferiores a la de la temperatura interna de las aves. Así, la cepa vaccínea, después de ser administrada a las gallinas, se replica de manera limitada y localmente. Los procedimientos de obtención de estas cepas reclasificantes son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en particular en los documentos WO 03/091401, WO 2006/063053 y por Wareing M.D. *et al.*, 2002, Vaccine 20: 2082-2090. La administración de la vacuna se realiza generalmente por nebulización. Otro medio de producir una cepa atenuada es truncar el gen que codifica para la proteína NS1 (Richt J.A. *et al.*, Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine, 2006, J. Virol., 80: 11009-18; Quinlivan M. *et al.*, Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein, 2005, J Virol., 79: 8431-9).

Las cepas vacvíneas pueden ser producidas mediante cualquier método, utilizando unas técnicas de cultivo sobre células tales como las células Vero, las células MDCK, las células PER.C6, o las células de embriones de pollos (CEK, PCJ)) y/o utilizando los procedimientos clásicos de producción sobre huevos embrionados. Los procedimientos de recogida, de purificación y según los casos de inactivación del virus son también bien conocidos por el experto en la materia.

Según otro modo de realización del procedimiento según la invención, la vacuna está en forma de proteínas producidas en un sistema de expresión *in vitro*. Por ejemplo, la HA se puede producir en sistema de expresión que utiliza un baculovirus recombinado en células de insecto. (Crawford J. *et al.*, Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes, 1999, Vaccine, 17: 2265-74). La hemagglutinina se puede expresar también *in vitro* en forma de "virus-like particles" (VLPs) (Prel A. *et al.*, Assessment of the protection afforded by triple baculovirus recombinant coexpressing H5, N3, M1 proteins against a homologous H5N3 low-pathogenicity avian influenza virus challenge in Muscovy ducks, 2007, Avian Dis., 51: 484-9; Pushko P. *et al.*, Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice, 2005, Vaccine, 23: 5751-9) o de pseudotipo a base de retrovirus (Szecsi J. *et al.*, 2006, Virol. J., 3: 70). Las proteínas producidas *in vitro* o las partículas virales producidas son más o menos purificadas y después añadidas con diferentes adyuvantes, tales como los utilizados con las vacunas inactivadas.

Según otro modo de realización del procedimiento según la invención, la vacuna contra la gripe comprende un vector que comprende un fragmento de ácido nucleico que codifica para la HA del virus de la gripe.

El término de vector hace referencia a estructuras de ácidos nucleicos que pueden ser propagadas y/o transferidas a unos organismos, unas células o unos componentes celulares. Esto incluye en particular los plásmidos, los virus, los bacteriofagos, los provirus, los fagemidos, los cromosomas artificiales que son capaces de replicarse de manera autónoma o que pueden integrarse en el cromosoma de una célula hospedante.

Por "vector que comprende el gen que codifica para la HA y/o NA del virus de la gripe", se entiende un vector que comprende el ácido nucleico que codifica para la HA y/o NA de interés y que, después de la introducción en una célula aviar expresa HA y/o NA en esta célula. Puede tratarse de un plásmido que expresa la HA de interés, pero generalmente se trata de un vector viral que contiene en su genoma el ácido nucleico que codifica para la HA de interés y que expresa la HA de interés en las células infectadas. La integración en el genoma del vector viral del ácido nucleico que codifica para la HA se lleva a cabo generalmente mediante unas técnicas de biología molecular, en particular la recombinación genética, la clonación, la genética inversa. La HA puede o no ser expresada en la superficie del vector viral. Preferiblemente, el vector viral se atenuó de manera clásica por múltiples pasos *in vitro* o por delección de algunos genes para que la replicación del virus vector en las células aviares sea suficientemente limitada y sin consecuencia sobre el estado general de las gallinas y considerado así como no patógeno. Como ejemplo de vectores virales, se citan los paramixovirus aviares (Ge J., *et al.*, Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses, 2007, J Virol., 81: 150-8); el herpesvirus de la pava (HVT) o de la enfermedad de Marek (Sondermeijer *et al.* 1993, Vaccine, 11, 349-358); el virus de la laringotraquea infecciosa (ILTV) (Veits J., *et al.*, Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague, 2003, J Gen. Virol., 84: 3343-52; Luschow D., *et al.*, Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene, 2001, Vaccine, 19: 4249-59); los adenovirus (Francois A., *et al.*, Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens, 2004, Vaccine, 22: 2351-60; Gao W., *et al.*, Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization, 2006, J Virol., 80: 1959-64; Toro H., *et al.*, Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector, 2007, Vaccine, 25: 2886-91); los coronavirus (Cavanagh, 2007, Vet Res. 38: 281-97; Eriksson, 2006, Clin. Dev. Immunol. 13: 353-60) pero se utilizan preferentemente para vacunar las gallinas, los poxvirus, en particular el virus de la viruela de la vaca, NYVAC (virus de la viruela de la vaca deletada), el virus de la viruela de la vaca MVA, particularmente los avipox, el canaripox, ALVAC (canaripox atenuado), el pigeon pox, el quail pox, el turkey pox, el sparrow pox y muy particularmente el fowl pox, TROVAC (fowlpox atenuado) que están descritos en particular en el documento AU 701599B, AU 701781B y en US 5,756,103. Según los casos, los vectores virales atenuados expresan sólo la HA de interés: se trata en particular de la vacuna que contiene un vector fowlpox TROVAC que expresa la HA de la cepa de virus gripal H5N8 (A/turkey/Ireland/1378/83). En otros casos, el vector atenuado expresa al mismo tiempo la HA de interés en asociación con una NA como el poxvirus recombinante descrito en 2003, Avian Pathology, 32: 25-32 que expresa al mismo tiempo la HA y la NA que provienen de una cepa de virus gripal H5N1. Una NA de interés es una NA que tiene habitualmente el mismo subtipo que la NA de la cepa viral contra la cual se busca inmunizar y proteger las gallinas. En otro caso más, el vector atenuado expresa varias HA de interés que pertenecen a subtipos diferentes, como en el caso del poxvirus recombinante descrito MingXiao M. *et al.*, 2006, Vaccine, 24: 4304-4311 que expresa al mismo tiempo los subtipos H5 y H7. El poder inmunógeno de estos vectores puede ser también reforzado introduciendo en ellos los genes que codifican unas citoquinas, chemokinas, que ejercen un poder inmunoestimulante como la IL-1, IFN, CSF, GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-18, TNF 5 (Vaccine, (2006), 24: 4304-4311). Las vacunas a base de vectores que codifican HA del

virus de la gripe pueden también ser añadidos para aumentar su inmunogenicidad.

Las composiciones vaccíneas que contienen unos vectores virales pueden ser administradas por diferentes vías que dependen en particular del vector: por ejemplo, transfusión de la membrana alar (vector poxvirus), por vía intramuscular, subcutáneo o transdermal con o sin aguja (cualquier vector), por vía *in ovo* (en el huevo embrionado de 17 a 19 días; por ejemplo, vector HVT/Marek y adenovirus), por vía ocular, oro-nasal, por spray o en el agua de bebida (vector paramixovirus, coronavirus, adenovirus), en una o dos inyecciones separadas por un intervalo de por lo menos 15 días. La(las) dosis vaccínea(s) administrada(s) son del orden de 1 a 7 log₁₀ unidad infecciosa al 50% con preferencia para una dosis de 2 a 4 log₁₀ para los vectores fowlpox. La ventaja de una vacunación a base de un vector viral con respecto a una vacunación clásica que utiliza virus gripal completo inactivado o atenuado reside en el hecho de que se puede distinguir a los animales vacunados de los animales infectados. Además, la vacunación con un vector viral favorece el desarrollo de una inmunidad celular que puede reforzar la protección de los animales. Como se ilustra en *Avian Dis.*, (2007), 51: 325-331 y *Avian Dis.*, (2007), 51: 498-500, el grado de protección obtenido en las gallinas y la disminución de la difusión del virus en los criaderos de aves de corral son del mismo orden que el que se observa con una vacuna clásica que contiene el virus gripal desactivado.

En los casos en los que la vacunación de las gallinas comprende varias inyecciones, la vacuna utilizada durante la primera administración puede ser diferente de la utilizada durante la segunda inyección o las siguientes. Se pueden utilizar dos vectores virales atenuados diferentes, como por ejemplo utilizar un vector ALVAC recombinante que expresa la HA de interés durante la primera inmunización y un vector TROVAC o NYVAC recombinante que expresa la misma HA de interés durante inmunizaciones siguientes de manera que la respuesta anticuerpo dirigida contra el vector ALVAC no impide la infección de las células de gallinas por el vector recombinante TROVAC o NYVAC recombinante y por lo tanto la expresión de la HA en las células infectadas. Se puede utilizar también el método denominado de "prime boost" que consiste en utilizar durante la primera inyección un vector viral atenuado que expresa una HA y en utilizar durante la o las inyecciones de recuerdo, una vacuna que contiene por ejemplo una o varias cepas vaccíneas inactivadas que pertenecen al mismo subtipo que la HA utilizada durante la primera vacunación, o bien proceder según un orden inverso. Se puede finalmente proceder a una vacunación ADN durante la primera inyección utilizando un plásmido que expresa la HA de interés, seguido de inyecciones de recuerdo utilizando una vacuna que contiene una cepa vaccínea inactivada y/o un vector viral atenuado que expresa una HA que pertenece al mismo subtipo que HA utilizada durante la primera vacuna o que es idéntico a la HA utilizada durante la primera vacunación.

Sea cual sea el tipo de vacuna administrado o el esquema de vacunación adoptado, la protección de las gallinas contra la gripe aviar está asegurada bastante rápidamente, generalmente en un plazo de 7 a 18 días después de la administración de una dosis vaccínea. Sin embargo, para asegurar una protección de las gallinas contra la gripe aviar durante todo el tiempo de su actividad ponedora de huevos, que dura aproximadamente un año, se recomienda una a dos vacunaciones de recuerdo, que se llevan a cabo en un plazo de 3 a 16 semanas después de la primera administración vaccínea. Varios esquemas de vacunación con vacunas inactivadas pueden ser utilizados en las gallinas ponedoras: por ejemplo, 2 inyecciones, la primera con 3 a 6 semanas de edad y la segunda con 16 a 19 semanas de edad justo antes del comienzo de la puesta de huevos, o 3 inyecciones, la primera alrededor de 2 a 4 semanas, la segunda 3 a 4 semanas más tarde y la tercera a 16 a 19 semanas de edad, justo antes de comenzar con la puesta de huevos. Un recuerdo puede también ser administrado durante la puesta. En el esquema "prime-boost" que utiliza 2 vacunas diferentes, los polluelos pueden ser vacunados con 1 día de edad con una vacuna a base de vector fowlpox; reciben después una (con 16 a 19 semanas de edad justo antes del comienzo de la puesta de huevos) o dos (con 3 a 6 semanas de edad y con 16 a 19 semanas de edad, justo antes del comienzo de la puesta de huevos) vacunaciones con una vacuna que contiene el virus gripal inactivado.

En la realización del procedimiento según la invención, se recogen preferentemente los huevos de las gallinas una vez que la protección de las gallinas contra la gripe aviar está asegurada, lo que se produce habitualmente en un plazo de 7 a 18 días después de la administración de la vacuna (Bublott M., *et al.* (2006, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081: 193-201); Van der Goot *et al.* (2005, *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 102: 18141-6); Ellis *et al.* (*Avian Pathol.* 2004, 33, 405-412).

A pesar de la presencia de anticuerpos antigripales en los huevos de las gallinas vacunadas, en particular de anticuerpos dirigidos contra la HA, y en particular de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación (IHA) que bloquean la penetración del virus de la gripe en las células sensibles, el procedimiento utilizado para producir el virus de la gripe a partir de huevos embrionados que provienen de gallinas vacunadas contra la gripe es clásico. Se utilizan unos huevos embrionados de 9 a 14 días, que provienen de gallinas vacunadas criadas, preferentemente, en un entorno controlado. El proceso de embriogénesis se controla de la siguiente manera: se utilizan unos huevos conservados a una temperatura comprendida entre 10 y 20°C, preferentemente entre 16 y 18°C, durante un tiempo que no excede en general de una semana después de la puesta de huevos. Se inicia el proceso de embriogénesis incubando los huevos a una temperatura de 37,5°C ± 1°C en un recinto húmedo que tiene una humedad relativa de 70 ± 10% durante un tiempo comprendido entre 9 y 14 días. Los huevos embrionados se seleccionan por espejismo, y sus cavidades alantoicas son infectadas con una dosis de virus generalmente comprendida entre 2 y 7 log₁₀ TCID₅₀ en un bajo volumen (aproximadamente 0,1 a 0,2 ml). Se deja el virus multiplicarse durante un periodo que va generalmente de 1 a 4 días en función de la virulencia de la cepa de virus y a una temperatura que puede variar

también en función del fenotipo de la cepa viral y de su grado de adaptación al frío o al calor. La temperatura de multiplicación del virus de la gripe se sitúa generalmente en un intervalo que va de 28 a 39°C y de manera habitual en un intervalo de temperatura que va de 33 a 39°C. Los líquidos alantoicos infecciosos son entonces recogidos y tratados en función de las utilizaciones que se desea realizar.

5 Este procedimiento puede servir para producir un virus de la gripe cuyo subtipo de la HA es diferente del subtipo de la HA contenida en la vacuna que sirvió para vacunar las gallinas. Se trata, por ejemplo, del caso en el que las gallinas son vacunadas con un virus inactivado H5N9 para proteger las gallinas contra la gripe aviar H5, mientras que los huevos de estas gallinas son infectados con un virus de la gripe H1N1 o H3N2, o incluso un virus de la gripe de tipo B para preparar una vacuna contra las formas epidémicas de la gripe humana actual. Según una variante del procedimiento según la invención, el subtipo de la HA del virus de la gripe producido utilizando los huevos embrionados de gallinas vacunadas tiene un subtipo diferente de la HA que sirvió para vacunar las gallinas pero contra la NA del virus de la gripe producido tiene el mismo subtipo que la NA del virus utilizado en la vacuna. Se trata, por ejemplo, del caso en el que las gallinas son vacunadas con una cepa de virus inactivada H5N1 o un poxvirus recombinante que expresa H5 y N1 para proteger las gallinas contra la gripe aviar, mientras que los huevos embrionados de las gallinas vacunadas son infectados con una cepa de virus H1N1.

20 Según otra modalidad del procedimiento según la invención, la HA del virus de la gripe producido sobre huevos embrionados de gallinas vacunadas tiene el mismo subtipo que la HA contenida en la vacuna que sirvió para vacunar las gallinas. Se trata, por ejemplo, del caso en el que las gallinas están vacunadas con el virus inactivado H5N1 o un poxvirus recombinante que expresa H5, mientras que los huevos de las gallinas vacunadas son infectados con un virus de la gripe H5N1 o H5N9. A pesar de la presencia de anticuerpos anti HA cross reactivos específicos “de subtipo” en el huevo (es el caso cuando HA contenida en la composición vacínica tiene el mismo subtipo que la HA de la cepa de virus de la gripe que infecta los huevos embrionados de gallinas vacunadas), esto no tiene efecto negativo sobre la replicación del virus.

30 Y de manera aún más sorprendente, esta replicación no está tampoco afectada en el caso en el que hay una identidad perfecta entre el virus de la gripe que es utilizado para infectar los huevos embrionados de gallinas vacunadas y el virus de la gripe utilizado para vacunar estas gallinas. Esto se traduce en este caso por la presencia, en los huevos, de un panel de anticuerpos anti HA aún más amplio ya que se encuentran al mismo tiempo unos anticuerpos anti HA cross reactivos específicos de subtipo y unos anticuerpos anti HA muy específicos de la cepa (también denominados anticuerpos específicos de cepas (véase el ejemplo 3). Contrariamente la opinión ampliamente establecida, la presencia de anticuerpos anti-gripe en el huevo y en particular la presencia de anticuerpos anti HA no afecta por lo tanto a la replicación del virus de la gripe. Las cantidades de virus y/o de antígeno hemaglutinante recogidos en los líquidos alantoicos infectados que provienen de huevos de gallinas vacunadas contra la gripe son del mismo orden que las recogidas en los líquidos alantoicos infectados que provienen de huevos de gallinas no vacunadas (véanse los ejemplos 1 y 2).

40 Se puede también sacar partido del procedimiento según la invención para fabricar una cepa de virus reclasificante. En este caso, se coinfectan en una primera etapa unos huevos embrionados de gallinas vacunadas con una cepa de virus salvaje y una cepa de virus maestra que se replica bien en los huevos embrionados como, por ejemplo, la cepa A/PR/8/34. En una segunda etapa, se recogen los líquidos alantoicos infectados que contienen esencialmente una mezcla de reclasificantes y la cepa maestra mientras que la cepa salvaje que tiene peores capacidades para replicarse está generalmente en cantidad muy baja. Se procede entonces a la selección de la cepa reclasificante que expresa al mismo tiempo las características fenotípicas de la cepa A/PR/8/34 (es decir su buena aptitud para replicarse en los huevos embrionados) y la HA así como la NA de la cepa salvaje por unas etapas de clonación sucesivas, mezclando en cada etapa de clonación el líquido alantoico infeccioso recogido con unos anticuerpos anti HA y anti NA específicos de A/PR/8/34 según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia. Se puede también fabricar una cepa reclasificante adaptada al frío y sensible al calor en la perspectiva de una vacuna de virus vivo atenuado. En este caso, se coinfectan en una primera etapa unos huevos embrionados de gallinas vacunadas con una cepa de virus salvaje y una cepa maestra que tiene como característica fenotípica estar adaptada al frío y sensible al calor. En este caso, la temperatura de incubación de los huevos infectados se lleva a cabo a una temperatura más baja de lo normal (la temperatura es frecuentemente inferior a 35°C, incluso inferior a 30°C). En una segunda etapa, se recogen los líquidos alantoicos infectados que contienen esencialmente una mezcla de reclasificantes y la cepa maestra, ya que la cepa salvaje sensible al frío no está replicada. Se procede entonces a la selección del reclasificante que expresa al mismo tiempo las características fenotípicas de la cepa maestra (en particular la adaptación al frío y/o su termosensibilidad) y la HA, así como la NA de la cepa salvaje por unas etapas de clonación, sucesivas mezclando en cada etapa de clonación el líquido alantoico infeccioso recogido con unos anticuerpos anti HA y anti NA específicos de la cepa maestra según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia.

65 El procedimiento según la invención se realiza en primera instancia para preparar unas vacunas destinadas a proteger los criaderos de gallinas y más generalmente los criaderos de aves domésticas (patos, pavas, ocas, etc.) contra la gripe aviar. Las cepas virales implicadas en las formas asintomáticas o ligeras de gripe aviar pueden ser de cualquier subtipo, y en particular los subtipos H9N2, H6N2, H7N2, H7N3 o H7N1. No conlleva mortalidad importante en los criaderos pero pueden ser la causa de una baja transitoria de la producción de huevos. Las cepas virales

altamente patógenas implicadas en las formas graves de gripe aviar que conllevan una mortalidad importante en los criaderos pertenecen generalmente a los subtipos H5 y H7, y en particular, H5N1, H5N2, H5N8, H5N9, H7N1, H7N3, H7N4 o H7N7.

5 Generalmente, la hemaglutinina del virus de la gripe contenida en la composición vacúnea que sirve para vacunar las gallinas contra la gripe aviar en la etapa a) del procedimiento según la invención y la hemaglutinina del virus que sirve para la infección de los huevos embrionados en la etapa c) del procedimiento tienen el mismo subtipo y se seleccionan en particular de entre los subtipos H5, H6, H7 y H9 ya que son los que se encuentran principalmente en las cepas de virus responsables de la gripe aviar.

10 En un aspecto particular, la hemaglutinina del virus de la gripe contenida en la composición vacúnea que sirve para vacunar las gallinas contra la gripe aviar en la etapa a) del procedimiento según la invención y la hemaglutinina del virus que sirve para la infección de los huevos embrionados en la etapa c) del procedimiento tienen el mismo subtipo y están seleccionadas entre los subtipos H5 y H7, ya que son los que se encuentran en las cepas de virus responsables de las formas graves de gripe aviar y/o de gripe humana que se han caracterizado pertenecen a los subtipos H5N1, H5N2, H7N1, H7N3 o H7N7.

20 Así, de manera muy particular, la invención tiene por objeto:

Un procedimiento de producción del virus de la gripe según el cual:

25 a. se vacunan unas gallinas con un virus de la gripe completo inactivado, según el cual la hemaglutinina del virus tiene el subtipo H5 o H7,

25 b. se recogen los huevos de gallinas vacunadas,

c. se activa el proceso de embriogénesis,

30 d. se infectan los huevos embrionados introduciendo en la cavidad alantoica de los huevos embrionados un virus de la gripe idéntico al que sirvió para la vacunación,

35 e. se incuban los huevos embrionados infectados en condiciones de temperatura y humedad que permiten la replicación del virus, y

f. se recoge el líquido alantoico que contiene el virus.

40 Cuando el esquema de vacunación de las gallinas prevé dos inyecciones, la primera inyección puede realizarse con una composición vacúnea que contiene, en lugar del virus de la gripe completo inactivado, un vector, generalmente un poxvirus, que comprende el gen que codifica para el subtipo H5 o H7, de la hemaglutinina del virus de la gripe.

45 Cuando los líquidos alantoicos infectados están destinados a la producción de una vacuna contra la gripe, el procedimiento según la invención comprende generalmente una etapa suplementaria de purificación de la cepa de virus y está eventualmente seguida o precedida de una etapa de inactivación viral, utilizando unos métodos bien conocidos por el experto en la materia, como los descritos en el documento FR 2201079 o en el documento FR 1538322.

50 La purificación puede ser sencilla y limitarse a una etapa de concentración del virus por centrifugación después de haber clarificado generalmente los líquidos alantoicos infectados. La purificación puede ser completada por una etapa de centrifugación zonal realizada por ejemplo mediante gradientes de densidad de sacarosa (EP 0 7760362). Se pueden utilizar asimismo unos procedimientos cromatográficos para purificar el virus. Se obtiene así una suspensión de virus completos purificados que entran en la composición de las vacunas completas inactivadas o de vacunas atenuadas.

55 La inactivación de la suspensión viral se lleva a cabo mediante medios clásicos, utilizando β -propiolactona (E. Budowsky *et al.* 1991, *Vaccine*, 9: 319-325; 1991, *Vaccine*, 9: 398-402; 1993, *Vaccine*, 11: 343-348), etilnimina o derivados (D. King 1991, *Avian Dis.* 35: 505-514) o formol (EP 0 776 0362).

60 La composición vacúnea a base de virus completos e inactivados se puede formular con uno o más adyuvantes. A pesar de que clásicamente, estas vacunas puedan ser formuladas con sales de aluminio o en una emulsión agua en aceite o aceite en agua (caso de las dos vacunas contra la gripe aviar), se utiliza habitualmente una emulsión agua en aceite compuesta de aceite de parafina, de un tensioactivo hidrófilo tal como el polisorbato 80, el polisorbato 83, el polisorbato 85 y de un tensioactivo lipófilo tal como el oleato de sorbitán, el sesquioleato de sorbitán, el trioleato de sorbitán. Se puede utilizar cualquier adyuvante susceptible de aumentar la respuesta humoral y/o celular contra la gripe. Como ejemplo de formulaciones adyuvantes no limitativas, se cita la emulsión MF59[®], las formulaciones a base de liposomas, unas formulaciones a base de MPL, de *Corynebacterium parvum*, de saponina, de lisolecitina,

de derivados plurónicos, o unas combinaciones de estas.

La suspensión de virus purificada puede sufrir asimismo unos tratamientos ulteriores. Se obtienen así unos productos derivados del virus de la gripe. Por ejemplo, se puede fragmentar la suspensión viral con la ayuda de agentes detergentes o de disolventes de los lípidos según métodos bien conocidos por el experto en la materia para fabricar por ejemplo unas vacunas a base de virus fragmentados o divididos, unos virosomas, o unas vacunas subunitarias que contienen la hemaglutinina del virus de la gripe. Los virus fragmentados o divididos, los virosomas que contienen la hemaglutinina del virus de la gripe, las vacunas subunitarias que contienen la hemaglutinina del virus de la gripe que se obtienen a partir del virus purificado son considerados como unos productos derivados del virus de la gripe. Las vacunas que contienen estos productos derivados pueden ser formuladas de la misma manera con uno o más adyuvantes.

Las vacunas obtenidas mediante el procedimiento según la invención se destinan a proteger al ser humano y al animal contra la gripe.

En el campo veterinario, la vacuna es principalmente utilizada en el campo de la prevención de la gripe aviar, pero se puede utilizar también para prevenir o reducir los síntomas de gripe y/o la excreción viral en los équidos, en particular el caballo, los cánidos, en particular el perro, los félicos, en particular el gato, los suidos, en particular el cerdo, los mustélidos, en particular el visón, el hurón, las especies aviares, en particular la gallina, el pato, la pava, la codorniz, la pintada, la oca, el avestruz. Cuando la composición vacvínea contiene una cepa de virus completo inactivado o un producto derivado, es generalmente administrada por vía subcutánea o intramuscular, o eventualmente en forma de nebulizado en los criaderos de aves de corral. Cuando la vacuna está en forma de un virus vivo atenuado, es generalmente administrada por vía oro-nasal, espray, agua de bebida o gotas en el ojo. El esquema de vacunación prevé generalmente una inyección o una inyección seguida de un recuerdo. La dosis vacvínea administrada depende del tamaño y de la edad del animal. Contiene habitualmente entre 20 y 200 μl de líquido alantoidiano que titra 10^8 a 10^{10} EID₅₀/ml antes de la inactivación, inyectada en un volumen comprendido entre 0,05 y 1 ml.

En el hombre, la vacuna se utiliza en el campo de la prevención de la gripe epidémica y de la gripe pandémica. Mientras que la gripe epidémica afecta a una población humana ya sensibilizada por contacto (por infección) o por vacunación con una o varias cepa(s) de virus de la gripe para la cual existe un parentesco antigénico con la HA de la cepa de virus responsable de la epidemia, y en la que existe una cierta inmunidad, incluso si es sólo parcialmente eficaz, la gripe pandémica afecta una población humana no sensibilizada con una nueva cepa de virus, ya que la HA de esta nueva cepa no tiene, o tiene muy poco, parentesco antigénico con las cepas de virus anteriores circulantes.

La vacuna contra la gripe epidémica se destina a proteger a la población humana contra formas de gripe de temporada ocasionadas por cepas de virus de la gripe circulantes de temporada que tiene un parentesco antigénico con cepas de virus anteriores que ya han circulado. Actualmente, las cepas de virus de la gripe responsables de la gripe epidémica que son unas cepas epidémicas de virus de la gripe son de tipo A y pertenecen a los subtipos H1N1 o H3N2 o son de tipo B.

La vacuna contra la gripe pandémica se destina a proteger a la población humana contra la infección por una cepa pandémica de virus de la gripe, que es una nueva cepa sin parentesco antigénico a nivel de la HA con unas cepas de virus anteriores circulantes.

La vacuna contra la gripe epidémica o pandémica puede estar en forma de vacuna viva atenuada o de vacuna inactivada, a pesar de que se prefiere una vacuna inactivada para la prevención de la gripe pandémica. La vacuna puede estar en forma de vacuna monovalente (vacuna preparada a partir de una sola cepa de virus de la gripe) o de vacuna multivalente (vacuna preparada a partir de varias cepas de virus de la gripe). La composición de la vacuna contra la gripe epidémica está actualmente en forma de vacuna trivalente preparada a partir de las cepas H3N2, H1N1 y de una cepa de virus de tipo B. La vacuna inactivada está generalmente en forma de virus completo, de virus fragmentado (virus dividido), de virosomas, o en forma subunitaria que contiene la HA y contiene eventualmente uno o varios adyuvantes como los anteriormente citados. Mientras que la vacuna viva atenuada es generalmente administrada por vía oral o nasal para favorecer el desarrollo de una inmunidad mucosal, la vacuna inactivada puede ser administrada por vía parenteral (vía intramuscular o subcutánea), por vía intradérmica o incluso por vía mucosal (vía intranasal) o incluso combinando dos vías de administración diferentes, tal como se describe en el documento WO 01/22992. El esquema de vacunación prevé generalmente una inyección o una inyección seguida de un recuerdo. La dosis vacvínea administrada depende de la edad de la persona y de la presencia o no de un adyuvante. Clásicamente, la dosis vacvínea contiene el equivalente de 15 μg de HA de cada cepa vacvínea contenida en la vacuna. Esta dosis puede ser disminuida hasta aproximadamente 1 a 2 μg de HA cuando la vacuna tiene adyuvantes, o aumentada a 30 μg de HA, incluso más, en la persona mayor o que padece déficit inmunitario.

Finalmente, la invención tiene por objeto:

La utilización de huevos de gallinas vacunadas contra la gripe para la producción de virus de la gripe o para la fabricación de una vacuna contra la gripe. Contrariamente a la opinión ampliamente establecida, la presencia de

anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina del virus de la gripe en los huevos de las gallinas vacunadas no afecta a la cantidad de virus de la gripe que se produce después de infectar sus cavidades alantoicas.

Los ejemplos siguientes ilustran de manera no limitativa diferentes modos de realización de la invención.

5

La figura 1 representa la secuencia nucleotídica completa del plásmido donante pJY 1394.1.

10

La figura 2 representa la secuencia nucleotídica de la muestra en el plásmido donante pJY 1394.1 que comprende los brazos que flanquean el locus de inserción F8, así como el promotor de la viruela de la vaca H6 seguido del gen sintético modificado a nivel del sitio de escisión, que codifica para la HA de la cepa A/chicken/Indonesia/7/03.

Los diferentes orígenes de estas secuencias son los siguientes:

15

* de 1 a 53: secuencia parcial del plásmido de clonación que comprende la secuencia de cebador M13F (subrayado)

* de 54 a 1483: secuencia del "brazo izquierdo" que flanquea el locus de inserción F8 en el genoma del vector TROVAC fowlpox

20

* de 1484 a 1568: secuencia de unión entre el brazo izquierdo y el promotor H6

* de 1569 a 1692: secuencia del promotor H6 del virus de la viruela de la vaca

25

* de 1693 a 3387: secuencia del gen sintético modificado HA de la cepa A/chicken/Indonesia/7/03; la secuencia en aminoácidos se indica encima de la secuencia nucleotídica utilizando el código 1 letra por aminoácido

* de 3388 a 3414: secuencia de unión entre el gen HA y el brazo derecho que comprende una secuencia TTTTAT de detención de transcripción de los genes precoces de fowlpox

30

* de 3415 a 4790: secuencia del "brazo derecho" que flanquea el locus de inserción F8 en el genoma del vector TROVAC fowlpox

* de 4791 a 4885: secuencia parcial del plásmido de clonación que comprende la secuencia del cebador M13R (subrayado)

35

Ejemplo 1: Procedimiento de producción de dos cepas vacvíneas A/New Caledonia/20/99 (H1N1) y A/New York/55/04 (H3N2) que sirven para la preparación de vacunas contra la gripe epidémica humana a partir de huevos embrionados de gallinas que han sido vacunadas, bien por dos inyecciones de una vacuna inactivada que contiene una cepa de virus de la gripe aviar A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9), bien por una inyección de un avipoxvirus recombinante que codifica para la HA de una cepa H5N1 seguida de una segunda inyección de una vacuna inactivada que contiene una cepa de virus de la gripe aviar A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9).

40

1.1) Protocolo de realización

45

1.1.1) Construcción del vector recombinante vFP2211

El vFP2211 es un virus fowlpox recombinante, en el genoma del cual se ha insertado un gen sintético que codifica para la hemaglutinina (HA) de la cepa H5N1 A/chicken/Indonesia/7/03. El gen HA se ha sintetizado a fin de obtener un cuadro abierto de lectura que codifica para una secuencia en aminoácido idéntica a la secuencia nativa de la cepa A/chicken/Indonesia/7/03 descrita en la base de datos de secuencias nucleotídicas GenBank bajo la referencia EF473080 (o de secuencias proteicas GenPept bajo la referencia ABO30346) con la excepción del sitio de escisión. La secuencia de aminoácidos RERRRKKRG situados entre las posiciones 339 y 347 (que corresponden al sitio de escisión de una cepa altamente patógena) se sustituyó por la secuencia RE---TRG. Este sitio de escisión así modificado corresponde al sitio de escisión de las cepas débilmente patógenas de subtipo H5.

50

55

En una primera etapa, se ha construido un plásmido donante pJY1394.1 que comprende el gen sintético HA modificado bajo el control del promotor de la viruela de la vaca H6 (Taylor J. *et al.*, Vaccine, 1988, 6: 504-508; Guo P. *et al.*, J. Virol., 1989, 63: 4189-4198; Perkus M. *et al.*, J. Virol., 1989, 63: 3829-3836.) y rodeado por los brazos flanqueantes del locus de inserción F8 a fin de permitir la inserción del gen HA en el locus de inserción F8 del genoma del vector fowlpox. El locus de inserción F8 corresponde al gen del fowlpox que codifica para la fotoliasa descrita por Srinivasan y Tripathy (2005, Veterinary Microbiology 108:215-223); este gen está también descrito bajo el nombre de FPV158 en la secuencia completa del genoma del fowlpox (GenBank, referencia AF198100). La inserción del gen HA y del promotor H6 en el locus F8 tiene como consecuencia la delección del gen FPV158 del genoma del virus fowlpox recombinante. La secuencia nucleotídica completa del plásmido pJY1394.1 así como la serie de secuencias nucleotídicas que bordean el gen HA (que figuran también en la secuencia completa del plásmido) están descritas respectivamente en las figuras 1 y 2.

60

65

El virus recombinante vFP2211 se ha obtenido después por doble recombinación entre los brazos flanqueantes del plásmido pJY1394.1 y el genoma del fowlpox. Para eso, unas células primarias de embriones de pollos se han transfectado con el plásmido pJY1394.1 linealizado por NotI e infectadas (multiplicidad de infección de 10) con la cepa parental fowlpox (vector TROVAC). El vector TROVAC deriva de la cepa vacvínea de la vacuna Diftosec producida por Merial contra la viruela del pollo. Los virus recombinantes se han seleccionado por hibridación específica sobre intervalo de lisis con una sonda que detecta el gen HA insertado. El vFP2211 así aislado se ha producido después en frascos rodantes sobre células de embrión de pollos.

1.1.2) Preparación de la vacuna inactivada H5N9

La vacuna inactivada H5N9 constituida de la cepa débilmente patógena H5N9 A/Chicken/Italy/22A/98 (proporcionada por el laboratorio de Ilaria Capua (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Virologia, Padova, Italia)), que se ha producido sobre huevos embrionados y inactivada con beta-propiolactona (BPL), y de una emulsión agua en aceite compuesta de aceite de parafina, de oleato de sorbitán y de polisorbato 80 se ha preparado según un procedimiento equivalente al descrito por Stone H. (1987, Avian Dis. 31: 483-490). La HLB (Balanza Lipófilo Hidrófilo) de la mezcla de tensioactivos de la emulsión tiene un valor de 5,3. Una dosis vacvínea equivale a 60 µl de líquido alantoidiano que titula $10^{8,9}$ EID₅₀/ml antes de la inactivación.

1.1.3) Vacunación de las gallinas ponedoras

Se han constituido dos grupos (G1 y G2) de polluelos de 1 día (D0) de tipo Leghorn, que tiene el estatuto de "libre de organismos patógenos específicos" (EOPS). Se aplicó al grupo G1 el esquema de vacunación siguiente: los polluelos de 1 día (D0) han recibido por vía subcutánea, en la base del cuello, con la ayuda de una jeringa de insulina, 0,2 ml de una suspensión viral de vFP2211 que titula 3,0 log₁₀ DICC₅₀/0,2 ml. Con 8 semanas de edad (S8), se efectuó la clasificación por sexo de los pollos. Se ha conservado aproximadamente 25 gallinas y 16 gallos, que se colocaron juntos. Con 17 semanas de edad (S17) han recibido una inyección de recuerdo de una dosis vacvínea con un volumen de 0,5 ml de la vacuna inactivada monovalente H5N9.

Se ha aplicado al grupo G2 el esquema de vacunación siguiente: los polluelos EOPS de 3 semanas han recibido por vía IM, en el quilla, con la ayuda de una jeringa de insulina, una dosis vacvínea con un volumen de 0,3 ml de la vacuna inactivada H5N9 monovalente. Con 8 semanas de edad (S8) se efectuó la clasificación por sexo de los pollos. Se conservaron aproximadamente 25 gallinas y 16 gallos, que colocaron juntos. A 17 semanas de edad (S17) han recibido una inyección de recuerdo de una dosis vacvínea con un volumen de 0,5 ml de la vacuna inactivada monovalente H5N9.

1.1.4) Protocolo de infección de los huevos que provienen de los pollos de los grupos G1, G2 y de gallinas no vacunadas con las cepas de virus A/New Caledonia/20/99 IVR-116 (H1N1) o A/New York/55/04 X-157 (H3N2).

Se evaluó la capacidad de replicación de las cepas vacvíneas reclasificantes A/New Caledonia/20/99 (xPR8) denominada A/New Caledonia/20/99 IVR-116 (H1N1) y A/New York/55/04 (xPR8) denominada A/New York/55/04 X-157 (H3N2) en los huevos de las gallinas del grupo G1 que fueron puestos con 40-41 (Ensayo 2) y 49-50 (Ensayo 3) semanas de edad y en los huevos de las gallinas G2 que fueron puestos con 26-27 (Ensayo 1), 40-41 (Ensayo 2) y 49-50 (Ensayo 3) semanas de edad. En paralelo, se ha evaluado de la misma manera la capacidad de replicación de las cepas de virus A/New Caledonia/20/99 (xPR8) (H1N1) y A/New York/55/04 (xPR8) (H3N2) en los huevos de control procedentes de gallinas EOPS no vacunadas (grupo control).

Todos los huevos puestos durante la semana se han conservado en un recinto a temperatura controlada (12 a 15°C). Los huevos de un mismo ensayo y que provienen del mismo grupo de animales se reunieron y después de activó el proceso de embriogénesis incubando los huevos durante 10 días a 37-38°C en un recinto cuya humedad relativa era de aproximadamente 70-80%. Después de 10 días de incubación, mediante una persona que examina los huevos, se verificó la vitalidad del embrión en cada huevo y se señaló con la ayuda de una cruz la cavidad alantoica. Los huevos embrionados de un mismo ensayo y que provienen del mismo grupo de animales se han reunido en grupos de 8 huevos. Los huevos embrionados de un mismo grupo se infectaron con la misma dosis infecciosa de virus de la gripe inyectado bajo un volumen de 200 µl a nivel de la cruz después de haber desinfectado y agujereado la cáscara del huevo. Se ensayaron las dosis infecciosas de 10², 10³ y 10⁴ EID₅₀ (Egg Infectious Dose 50%) de virus A/New Caledonia/20/99 (xPR8) (H1N1) y A/New York/55/04 (xPR8) (H3N2). Las dosis infecciosas de 10³ y 10⁴ EID₅₀ por huevo se ensayaron en los huevos de los ensayos 1 y 2. Las dosis infecciosas de 10² y 10³ EID₅₀ por huevo se ensayaron en los huevos del ensayo 3. Los huevos embrionados infectados se incubaron después a 34°C durante 48 horas en un recinto cuya humedad relativa era del 80%, y después colocados durante una noche a +4°C. Después, se extrajo el líquido alantoico infectado de cada huevo. Se evaluó el título infectante sobre cada líquido alantoico extraído midiendo el título UHA (unidades hemaglutinantes). Para medir los títulos UHA de los líquidos alantoicos infectados por la cepa A/New York/55/04 (xPR8) (H3N2), se utilizaron unos glóbulos rojos de pava. Para medir los títulos UHA de los líquidos alantoicos infectados por A/New Caledonia/20/99 (xPR8) (H1N1), se utilizaron unos glóbulos rojos de gallina. El título UHA se expresó por la inversa de la última dilución del líquido alantoico infectado, que mostraba una hemaglutinación visible en presencia de una suspensión de glóbulos rojos de gallina o de pava al 0,5% en tampón fosfato.

1.2) Resultados

5 Las medias de los títulos UHA obtenidos en los huevos que provienen de los diferentes grupos de gallinas vacunadas y no vacunadas en función de la dosis infecciosa de virus inyectada en los huevos y en función del momento de la recogida de los huevos se reúnen en las tablas I y II.

10 Tabla I: Títulos hemaglutinantes obtenidos en los líquidos alantoicos en función de la dosis infectante de A/New Caledonia/20/99 (xPR8) (H1N1) utilizada, de la procedencia de los huevos (G1, G2, control no vacunado) y del momento en el que los huevos han sido puestos (ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3).

Dosis infectante (EID ₅₀ /huevo)	100	1000			10000	
Grupo	ensayo 3	ensayo 1	ensayo 2	ensayo 3	ensayo 1	ensayo 2
Control no vacunado	640*	1050	1660	1280	861	1522
G1 (vFP2211/Vac. Inact. H5N9)	1140	NA	1974	830	NA	1974
G2 (Vac. Inact. H5N9/Vac. Inact. H5N9)	806	905	1660	1159	905	1974
*: Título hemaglutinante (UHA) expresado en la forma de media geométrica de los 8 títulos UHA/50 µl obtenidos sobre los líquidos alantoicos de los 8 huevos incluidos en cada condición. NA: No aplicable						

15 Tabla II: Títulos hemaglutinantes obtenidos en los líquidos alantoicos en función de la dosis infectante de A/New York/55/04 (xPR8) (H3N2) utilizada, de la procedencia de los huevos (G1, G2, control no vacunado) y del momento en el que los huevos han sido puestos (ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3).

Dosis infectante (EID ₅₀ /huevo)	100	1000		10000
Grupo	ensayo 3	ensayo 1	ensayo 3	ensayo 1
Control no vacunado	211*	861	349	830
G1 (vFP2211/Vac. Inact. H5N9)	88	NA	254	NA
G2 (Vac. Inact. H5N9/Vac. Inact. H5N9)	254	987	557	844
*:Título hemaglutinante (UHA) expresado en la forma de media geométrica de los 8 títulos UHA/50µl obtenidos sobre los líquidos alantoicos de los 8 huevos incluidos en cada condición. NA: No aplicable				

20 Los resultados obtenidos en las tablas I y II muestran que las medias de los títulos UHA de los líquidos alantoicos de los huevos que proceden de gallinas vacunadas (G1 y G2) son equivalentes a las medias de los títulos UHA de los líquidos alantoicos de los huevos que proceden de gallinas no vacunadas.

25 Se realizó un análisis estadístico para estudiar los factores de vacunación y dosis. Los valores individuales de UHA se transformaron en log₂ y después se analizaron con la ayuda de un modelo de varianza. La heterogeneidad de las varianzas se ensayó con la ayuda del ensayo de extensión reducida, efectuado sobre los residuos del modelo (programa SAS v8.2).

30 El análisis estadístico realizado sobre los valores individuales de los títulos UHA ha mostrado que no había efecto de vacunación. No había tampoco ningún efecto relacionado con la dosis de virus que sirvió para la infección de los huevos. Los títulos UHA no fluctuaron de manera sensible durante el periodo de puesta estudiado (que va de 26 semanas (ensayo 1) a 50 semanas (ensayo 3)).

35 Ejemplo 2: Procedimiento de producción de dos cepas vacvíneas pandémicas A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) y A/Vietnam/1194/04 NIBRG14 (H5N1) a partir de huevos embrionados de gallinas vacunadas, bien por inyecciones de una vacuna inactivada que contiene una cepa de virus de la gripe aviar A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9), o bien por inyección de un avipoxvirus recombinante que codifica para la HA de una cepa H5N1 seguida de una segunda inyección de una vacuna inactivada H5N9 que contiene una cepa de virus de la gripe aviar.

2.1.1) Vacunación de las gallinas

40 El protocolo de vacunación de las gallinas fue idéntico al que se utilizó en el ejemplo 1.

2.1.2) Protocolo de infección de los huevos que proceden de gallinas de los grupos G1, G2 y de gallinas no vacunadas con las cepas de virus A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) y A/Vietnam/1194/04 NIBRG14 (H5N1).

45 El protocolo de infección fue el mismo que el utilizado en el ejemplo 1, salvo las modificaciones siguientes:

Se utilizó la cepa aviar débilmente patógena A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) que proviene del laboratorio Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Virologia, Padova, Italy y una cepa vaccínea reclasificante pandémica atenuada A/Vietnam/1194/04 NIBRG14 (H5N1) para infectar los huevos. Esta última cepa fue proporcionada por el laboratorio National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG, UK y se obtuvo por genética inversa, como se describe por Nicolson C. *et al.*, Génération of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system, 2005, Vaccine, 23:2943-2952.

Las dosis infecciosas de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 EID₅₀ (Egg Infectious Dose 50 %) se ensayaron para estas dos cepas. Las dosis infecciosas de 10^3 , 10^4 y 10^5 EID₅₀ por huevo se ensayaron en los huevos del ensayo 1. Las dosis infecciosas de 10^4 et 10^5 EID₅₀ por huevo se ensayaron en los huevos del ensayo 2. Las dosis infecciosas de 10^2 y 10^3 EID₅₀ por huevo se ensayaron en los huevos del ensayo 3.

Para medir los títulos UHA de los líquidos alantoicos infectados por A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) o A/Vietnam/1194/04 NIBRG14 (H5N1), se utilizaron los glóbulos rojos de gallina.

2.2) Resultados

Los títulos UHA obtenidos en los huevos que provienen de los diferentes grupos de gallinas vacunadas y no vacunadas en función de la dosis infecciosa de virus inyectada en los huevos y en función del momento de la extracción de los huevos se reúnen en las tablas III y IV.

Tabla III: Títulos hemaglutinantes obtenidos en los líquidos alantoicos en función de la dosis infectante de A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) utilizada, de la procedencia de los huevos (G1, G2, control no vacunado) y del momento en el que los huevos han sido puestos (ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3).

Dosis infectante (EID ₅₀ /huevo)	100	1000		10000		100000	
Grupo	ensayo 3	ensayo 1	ensayo 3	ensayo 1	ensayo 2	ensayo 1	ensayo 2
Control no vacunado	35*	53	32	53	64	54	53
G1 (vFP2211/Vac. Inact. H5N9)	64	NA	54	NA	59	NA	86
G2 (Vac. Inact. H5N9/Vac. Inact. H5N9)	102	64	57	59	70	102	59

*: Título hemaglutinante (UHA) expresado en la forma de media geométrica de los 8 títulos UHA/50 µl obtenidos sobre los líquidos alantoicos de los 8 huevos incluidos en cada condición.
NA: No aplicable

Tabla IV: Títulos hemaglutinantes obtenidos en los líquidos alantoicos en función de la dosis infectante de A/Vietnam/1194/04 (H5N1) RG14 utilizada, de la procedencia de los huevos (G1, G2, control no vacunado) y del momento en el que los huevos han sido puestos (ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3).

Dosis infectante (EID ₅₀ /huevo)	1000	10000		100000	
grupo	ensayo 1	ensayo 1	ensayo 2	ensayo 1	ensayo 2
Control no vacunado	194*	232	197	172	181
G1 (vFP2211/Vac. Inact. H5N9)	NA	NA	197	NA	166
G2 (Vac. Inact. H5N9/Vac. Inact. H5N9)	152	279	215	181	235

*: Título hemaglutinante (UHA) expresado en la forma de media geométrica de los 8 títulos UHA/50 µl obtenidos sobre los líquidos alantoicos de los 8 huevos incluidos en cada condición.
NA: No aplicable

Los resultados presentados en las tablas III y IV, así como el análisis estadístico muestran que los títulos UHA de los líquidos alantoicos que proceden de los huevos de gallinas vacunadas (G1 y G2) son similares a los títulos UHA de los líquidos alantoicos de los huevos de gallinas no vacunadas, incluso en la situación en la que las gallinas se vacunaron con una cepa idéntica a la que se utilizó para infectar los huevos embrionados que proceden de estas gallinas (caso de los grupos G1 y G2 inmunizados con la cepa A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9). No hay tampoco ningún efecto relacionado con la dosis de virus que sirve para la infección de los huevos. Los títulos UHA no han fluctuado de manera sensible durante el periodo de puesta estudiado (que va de 26 semanas (ensayo 1) a 50 semanas (ensayo 3)).

El análisis estadístico se realizó como en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Análisis de la respuesta en anticuerpos maternos anti-H5 en los huevos de gallinas vacunadas con la

cepa vacvínea A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9)

3.1) protocolo de realizaci3n

5 Se midi3 la presencia de anticuerpos anti-H5 en los huevos de las gallinas de los grupos G1 y G2 que han sido vacunadas con la cepa A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) seg3n el protocolo descrito en el p3rrafo 1.1.1). Paralelamente, se analiz3 tambi3n la respuesta anti H5 en las yemas de huevos de gallinas no vacunadas (grupo control).

10 Se analiz3 la respuesta anti H5 en las yemas de huevos (o l3quidos "vitelinos") que han sido extra3dos en el momento de los ensayos 1 (S26-27), 2 (S40-41) y 3 (S49-50). El an3lisis de la respuesta anti-H5 en las yemas de huevos del ensayo 1 se realiz3 antes de la embriog3nesis (D0) y despu3s de la embriog3nesis (D10) (es decir despu3s de la fase de incubaci3n de 10 d3as a 37°C). El an3lisis de las respuestas anti H5 en las yemas de huevos de los ensayos 2 y 3 se realiz3 3nicamente despu3s de la embriog3nesis (D10). El mismo an3lisis se realiz3

15 asimismo con huevos que proceden de gallinas no vacunadas (v3ase el p3rrafo 3.2.2). Se estudi3 tambi3n la respuesta anti H5 en los l3quidos alantoicos de los huevos del ensayo 2 despu3s de la embriog3nesis (D10). Las yemas de huevos se extrajeron por aspiraci3n mediante una pipeta de boquilla desechable. Con la excepci3n del ensayo 1, en el que las yemas se guardaron congeladas sin haber sido previamente diluidas, las yemas de huevos de los ensayos 2 y 3, y los l3quidos alantoicos se diluyeron previamente al 1/5 en tamp3n fosfato antes de la congelaci3n. Las yemas de huevos diluidas y los l3quidos alantoicos se conservaron congelados hasta el momento del ensayo de los anticuerpos anti H5, que se realiz3 utilizando el m3todo de an3lisis por inhibici3n de hemaglutinaci3n (IHA) de los gl3bulos rojos de gallinas, que se produce en presencia de la cepa A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9). El ensayo se bas3 en la capacidad de los anticuerpos neutralizantes dirigidos

20 espec3ficamente contra la HA el virus para inhibir la actividad "hemaglutinante" del virus. En este ensayo, se utiliz3 un suero de carnero anti A/Vietnam/1194/04 proporcionado por el NISBC como control positivo y del suero de rat3n sin tratamiento previo como control negativo. Se realizaron unas diluciones sucesivas de raz3n 2 de las extracciones (yemas de huevos diluidas o l3quidos alantoicos) en una microplaca de fondo c3nico a fin de obtener 50 µl de cada una unas diluciones por pocillos. Se a3adieron en cada pocillo 50 µl de una suspensi3n viral que titula 4 unidades hemaglutinantes (4HAU) y que provienen de un l3quido alantoico clarificado que se infect3 mediante la cepa A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) proporcionada por el laboratorio de Ilaria Capua (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Virologia, Padova, Italy). Se dej3 incubar durante 1 hora a la temperatura del laboratorio antes de a3adir 50 µl de una soluci3n de gl3bulos rojos de gallina al 0,5% en tamp3n fosfato. Se dej3 reposar durante 1 hora a +4°C antes de efectuar la lectura del ensayo. La presencia de una inhibici3n de hemaglutinaci3n se traduc3a por la presencia de un punto rojo en el fondo del micropocillo, mientras que la presencia de una hemaglutinaci3n se traduc3a por la presencia de un halo rosado en el micropocillo. El t3tulo en anticuerpos IHA estaba representado por la inversa de la 3ltima diluci3n, en la que no se observa ninguna hemaglutinaci3n en el micropocillo.

3.2) Resultados

40 3.2.1) an3lisis de la respuesta anti-H5 en las yemas de huevos del ensayo 1

45 A D0, 8 de las 8 yemas de huevos analizadas del grupo no vacunado eran negativas en el ensayo IHA, mientras que 6 de las 8 yemas de huevos que provienen del grupo 2 eran positivas en el ensayo IHA, lo que indicaba la presencia de anticuerpos anti-H5.

A D0, 4 de las 4 yemas de huevos analizadas del grupo no vacunado eran negativas en el ensayo IHA, mientras que 4 de las 4 yemas de huevos que provienen del grupo 2 era positivas en el ensayo IHA.

50 3.2.2) an3lisis de la respuesta anti-H5 en las yemas de huevos y los l3quidos alantoicos del ensayo 2.

55 A D10, 5 de las 5 yemas de huevos analizadas del grupo no vacunado eran negativas en el ensayo IHA, mientras que 4 de las 5 yemas de huevos que provienen del grupo 1, y 4 de las 5 yemas de huevos que provienen del grupo 2 eran positivas en el ensayo IHA, lo que indicaba la existencia de anticuerpos anti-H5 en estos grupos. Los valores individuales de los t3tulos IHA obtenidos se re3nen en la tabla V.

Tabla V: t3tulos IHA de las yemas de huevos extra3das despu3s de la embriog3nesis (D10)

Yemas de huevos	D10*
	160
Grupo 1	80
(vFR2211/Vac. Inact. H5N9)	320
	80
	<5

Yemas de huevos	D10*
	80
Grupo 2	160
(Vac. Inact. H5N9/Vac. Inact. H5N9)	40
	40
	<5
	<5
Grupo no vacunado	<5
	<5
	<5
	<5
*: los títulos a D10 provienen de yemas de huevos diferentes	

Por el contrario, todos los líquidos alantoicos que provienen de los grupos 1 y 2 eran negativos en el ensayo IHA, lo que significa que no había anticuerpos que inhiban la hemaglutinación del virus de la gripe H5N9 detectables en los líquidos alantoicos.

5

3.2.3) análisis de la respuesta anti-H5 en las yemas de huevos del ensayo 3

A D10, 5 de las 5 yemas de huevos analizadas del grupo no vacunado eran negativas en el ensayo IHA, mientras que 5 de las 5 yemas de huevos que provienen del grupo 1 eran positivas en el ensayo IHA.

10

Los valores individuales de los títulos IHA se reúnen en la tabla VI.

Tabla VI: títulos IHA de las yemas de huevos extraídas después de la embriogénesis (D10) en función de la procedencia de los huevos

15

Yemas de huevos	D10
Grupo 1 (vFP2211/Vac. Inact. H5N9)	80
	80
	160
	5
	320
Grupo no vacunado	<5
	<5
	<5
	<5
	<5

En conclusión, en base a los resultados de los ejemplos 2 y 3, la presencia de anticuerpos maternos anti H5N9 que se reveló en las yemas de huevos de los 3 ensayos no tiene incidencia en la productividad vírica de los líquidos alantoicos infectados por una cepa H5N1 o H5N9.

20

Ejemplo 4: Análisis de la respuesta serológica de las gallinas vacunadas con la cepa vacvínea A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9) y de los anticuerpos maternos presentes anti-H5 en los huevos de estas gallinas vacunadas

25

Se efectuaron unas extracciones sanguíneas con 28 y 36 semanas de edad en las gallinas vacunadas de los grupos 1 y 2. Los huevos puestos por estas gallinas se recogieron a las 27 y 37 semanas para evaluar la importancia de la transferencia de los anticuerpos maternos en las yemas de huevos. La respuesta anticuerpo anti-H5 se evaluó mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación, utilizando como antígeno la cepa H5N9 A/chicken/Italy/22A/98 homóloga a la cepa de la vacuna inactivada. Los resultados son expresados en log₁₀ en la tabla VII.

30

Tabla VII: Porcentaje de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación (antígeno H5N9 A/chicken/Italy/22A/98) en el suero de las gallinas ponedoras vacunadas y en el vitelo de los huevos puestos por estas gallinas.

	Suero	Vitelo	Suero	Vitelo
Semana de edad	28	27	36	37
G1	2,10±0,61 (15)*	1,96±0,94 (21)**	1,92±0,91 (15)	1,63±0,89 (10)

	Suero	Vitelo	Suero	Vitelo
G2	2,20±0,62 (15)	1,81±0,88 (13)	2,26±0,65 (15)	1,43±0,89 (14)

* media geométrica de los títulos en anticuerpos que inhiben la hemaglutinación expresada en $\log_{10} \pm$ desviación típica (número de muestras ensayadas por grupo)

5 ** la dilución más baja ensayada sobre los vitelos es de 1/10 (1 \log_{10}); para el cálculo de las medias y de la desviación típica, los valores de los huevos negativos en la dilución 1/10 se pusieron a 0,7 \log_{10} .

Tabla VIII: Porcentaje de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación (antígeno H5N9 A/turkey/Wisconsin/68) en el vitelo de los huevos puestos por las gallinas vacunadas de los grupos 1 y 2.

	Vitelo
Semana de edad	27
G1	1,67±0,79 (21)*
G2	1,39±0,80 (13)

10 * media geométrica de los títulos en anticuerpos que inhiben la hemaglutinación expresada en $\log_{10} \pm$ desviación típica (número de muestras ensayadas por grupo); la dilución más baja ensayada es de 1/10 (1 \log_{10}); para el cálculo de las medias y de la desviación típica, los valores de los huevos negativos en la dilución 1/10 se pusieron a 0,7 \log_{10} .

15 Estos resultados confirman la transmisión de los anticuerpos maternos en la yema de huevos de los huevos puestos por las gallinas vacunadas de los grupos 1 y 2.

20 Los porcentajes de anticuerpos anti-H5N9 homólogos (tabla VII) en el vitelo son superiores a los títulos anti-H5N9 heterólogos (tabla VIII) a pesar de que esta diferencia no sea estadísticamente significativa.

Ejemplo 5: producción de la cepa H5N9 A/turkey/Wisconsin/68 sobre unos huevos puestos por las gallinas vacunadas por una vacuna inactivada H5N9 (cepa A/chicken/Italy/22A/98) del grupo 2

25 5.1. Protocolo de realización

Los huevos (aproximadamente 220-230) de las gallinas del grupo 2 vacunadas 2 veces con 3 y 17 semanas de edad con la vacuna inactivada H5N9 (cepa A/chicken/Italy/22A/98) se extrajeron durante las semanas 28 y 29. Estos huevos, después del almacenamiento a temperatura controlada (entre 12 y 15°C), se incubaron a 37°C durante 11 días. Después de la visualización para verificar la buena viabilidad de los embriones, los huevos se inocularon en la cavidad alantoica con 0,2 ml de una dilución de una solución viral de reserva de la cepa H5N9 A/turkey/Wisconsin/68 que titula 9,68 \log_{10} EID₅₀/ml (inóculo). Se formaron siete grupos de aproximadamente 30 huevos. Se inocularon cuatro grupos (G1 a G4) con las diluciones siguientes del inóculo: 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ y 10⁻². Se inocularon otros tres grupos (G5 a G7) con la dilución 10⁻³ del inóculo. Después de la inoculación, los huevos se incubaron a 37°C±1,5°C bajo 70 %±10 % de humedad. Después de 20h de incubación, los huevos se visualizaron para eliminar los huevos muertos procedentes de la inoculación y se reincubaron en las mismas condiciones. Cuarenta y dos horas después de la inoculación, los huevos se pusieron en frío antes de extraer el líquido alantoico. Se reunieron los líquidos alantoicos de los huevos de los grupos 1 a 4 (una acumulación de líquido por grupo). Los líquidos alantoicos de los 4 grupos de huevos se almacenaron a -70°C antes del titulado en unidad hemaglutinante y en dosis infecciosa al 50% para el huevo (EID₅₀).

5.2. Resultados

Los resultados se reúnen en la tabla IX.

45 Tabla IX: Títulos hemaglutinantes e infecciosos obtenidos después de la producción de la cepa H5N9 A/turkey/Wisconsin/68 sobre unos huevos que provienen de gallinas vacunadas con una vacuna inactivada que contiene la cepa H5N9 A/chicken/Italy/22A/98.

Grupo	Dilución del inóculo	Título en unidad hemaglutinante (\log_{10})	Título infeccioso EID ₅₀ (\log_{10} /ml)
1	10 ⁻⁵	2,25	9,50
2	10 ⁻⁴	2,40	9,33
3	10 ⁻³	2,25	9,67
4	10 ⁻²	2,40	9,88

50 Estos resultados muestran unos títulos muy similares entre los grupos, y por lo tanto no hay efecto alguno de la dilución del inóculo. Además, los títulos obtenidos son muy elevados y son comparables a los obtenidos sobre

ES 2 541 551 T3

huevos que no poseen anticuerpos maternos anti-H5N9 (datos históricos del laboratorio). Estos resultados confirman por lo tanto que, en las condiciones ensayadas, la presencia de anticuerpos maternos en los huevos no interfiere con la producción de un virus de la gripe de mismo subtipo.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sanofi Pasteur
 Merial Limited

10 <120> Procedimiento de producción del virus de la gripe
 <130> PM 0706
 <140> 0757884
 <141> 26-09-2007
 <160> 3

15 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virus aviar de la influenza
 <220>

20 <221> Secuencia de la proteína HA del virus de la gripe aviar A/chicken/Indonesia/7/03
 <222> (1)..(564)
 <223> Secuencia en aminoácido codificada por el gen sintético HA modificado a nivel del sitio de escisión
 <400> 1

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

ES 2 541 551 T3

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

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 541 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

<210> 2

<211> 7618

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> plásmido donante pJY1394.1

<400> 2

ES 2 541 551 T3

ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgtta aatTTTTgtt aaatcagctc	60
atTTTTtaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtgttgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccaactacgtg aaccatcacc	240
ctaatcaagt ttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcgggaacc ctaaagggag	300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
agcgaagga gcggcgctc gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgttg gaaggcgat cggcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgaat tgtaatacga ctcaactatag ggcgaattgg gtgacccttt	660
acaagaataa aagaagaac aactgtgaaa tagttataa atgtaattcg tatgcagaaa	720
acgataatat attttggtat gagaaatcta aaggagacat agtttgtata gacatgcgct	780
cttccgatga gatattogat gcttttctaa tgtatcatat agctacaaga tatgcctatc	840
atgatgatga tataatatcta caaatagtgt tatattattc taataatcaa aatggtatat	900
cttatattac gaaaaataaa tacgttaagt atataagaaa taaaactaga gacgatattc	960
ataaagtaaa aatattagct ctagaagact ttacaacgga agaaatatat tgttgatta	1020
gtaatatata acagcgtagc tgcacggttt tgatcatttt ccaacaatat aaaccaatga	1080
aggaggacga ctcatcaaac ataaataaca ttcacggaaa atattcagta tcagatttat	1140
cacaagatga ttatgttatt gaatgtatag acggatcttt tgattcgatc aagtatagag	1200
atataaagggt tataataatg aagaataacg gttacgttaa ttgtagtaaa ttatgtaaaa	1260
tgcggaataa atacttttct agatggttgc gtctttctac ttctaaagca ttattagaca	1320
tttacaataa taagtcagta gataatgcta ttgttaaagt ctatggtaaa ggtaagaaac	1380
ttattataac aggattttat ctcaaacaaa atatgatagc ttatgttatt gagtggatag	1440
gggatgattt tacaacgat atatacaaaa tgattaattt ctataatgcg ttattcggta	1500
acgatgaatt aaaaatagta tcctgtgaaa acactctatg cccgtttata gaacttgta	1560
gatgctatta tggtaaaaaa tgtaagtata tacacggaga tcaatgtgat atctgtggtc	1620
tatatatact acaccctacc gatattaacc aacgagtttc tcacaagaaa acttgtttag	1680
tagatagaga ttctttgatt gtgtttaaaa gaagtaccag taaaaagtgt ggcataatgca	1740
tagaagaat aaacaaaaaa catatttccg aacagtattt tgggaattctc ccaagttgta	1800

ES 2 541 551 T3

aacatatttt	ttgcctatca	tgtataagac	gttgggcaga	tactaccaga	aatacagata	1860
ctgaaaatac	gtgtcctgaa	tgtagaatag	tttttccttt	cataatacco	agtaggtatt	1920
ggatagataa	taaatatgat	aaaaaatat	tatataatag	atataagaaa	atgattttta	1980
caaaaatacc	tataagaaca	ataaaaatat	aattacattt	acggaaaata	gctggtttta	2040
gtttaccaac	ttagagtaat	tatcatattg	aatctatatt	gctaattagc	taataaaaac	2100
ccgggttaat	taattagtca	tcaggcaggg	cgagaacgag	actatctgct	cgtaattaa	2160
ttagagcttc	tttattctat	acttaaaaag	tgaaaataaa	tacaaagggt	cttgagggtt	2220
gtgttaaatt	gaaagcgaga	aataatcata	aattatttca	ttatcgcgat	atccgttaag	2280
tttgtatcgt	aatggagaaa	atcgtgctgc	tgctggccat	cgtgagcctg	gtgaaaagcg	2340
atcagatctg	catcggtac	cacgccaaca	acagcacaga	gcaagtggac	acaatcatgg	2400
aaaagaacgt	gaccgtgaca	cacgcccagg	acatcctgga	aaagacacac	aacgggaagc	2460
tgtycgatct	ggatggagtg	aagcctctga	tcctgagaga	ttgcagcgtg	gccgatggc	2520
tgctggggaa	cccaatgtgc	gacgaattca	tcaacgtgcc	cgaatggagc	lacatcgtgg	2580
agaaggccaa	cccagccaac	gacctgtgct	accagggaa	cctgaacgac	tacgaagaac	2640
tgaaacacct	gctgagcaga	atcaaccact	ttgagaaaat	ccagatcatc	ccaaaagca	2700
gctggtccga	tcacgaagcc	agcagcggag	tgagcagcgc	ctgccatac	cagggaagt	2760
ccagcttttt	tagaaactgt	gtgtggctga	tcaaaaagaa	cagcgcctac	ccaacaatca	2820
agagaagcta	caacaacacc	aaccaggaag	atctgctggt	gctgtggggg	atccaccacc	2880
ctaacgatgc	cgccgagcag	acaaggctgt	accagaacct	aaccacctac	atctccgtgg	2940
ggacaagcac	actgaaccag	agactggtgc	caaaaatcgc	catcagatcc	aaagtgaacg	3000
ggcagagcgg	aagaatggag	ttcttctgga	caatcctgaa	acccaacgat	gccatcaact	3060
tcgagagcaa	cggaaacttc	atcgtcccag	aatacgccta	caaaatcgtg	aagaaagggg	3120
acagcgcct	catgaaaagc	gaactggaat	acggcaactg	caacaccaag	tgccagacct	3180
caatgggggc	catcaacagc	agcatgccat	tcacaacat	ccaccctctg	accatcgggg	3240
aatgcccaca	atcgtgaaa	agcaacagac	tggtgctggc	caccgggctg	agaaacagcc	3300
ctcagagaga	gaccagagga	ctgtttggag	ccatcgcggg	ctttatcgag	ggaggatggc	3360
agggaatggt	ggatggctgg	tacggatacc	accacagcaa	cgagcagggg	agcggatacg	3420
ccgccgacaa	agaatccacc	cagaaggcca	tcgacggcgt	gaccaacaaa	gtgaacagca	3480
tcatcgacaa	aatgaacacc	cagtttgagg	ccgtgggaag	ggagttaaac	aacctggaaa	3540
ggagaatcga	gaacctgaac	aagaagatgg	aggacggatt	cctggatgtg	tggacctaca	3600
acgccgaact	gctggtgctg	atggaaaacg	agagaacctt	ggactttcac	gacagcaacg	3660

ES 2 541 551 T3

tgaagaacct	gtacgacaaa	gtgaggctgc	agctgagggg	taacgcccaag	gagctgggca	3720
acggctgctt	cgagttctac	cacaaatgcg	ataacgaatg	catggaaagc	atcagaaacg	3780
gaacctacaa	ctacccccag	tacagcgaag	aagccagact	gaaaagagaa	gaaatctccg	3840
gagtgaaact	ggaatccatc	ggaacctacc	agatcctgag	catctacagc	acagtggcct	3900
cctccctggc	cctggccatc	atgatggccg	gactgagcct	gtggatgtgc	tccaacggaa	3960
gcctgcagtg	cagaatctgc	atctgactcg	agtttttatt	gactagttaa	tcataagata	4020
aataatatac	agcattgtaa	ccatcgtcat	ccgttatacg	gggaataata	ttaccataca	4080
gtattattaa	atcttcttac	gaagaatata	gatcgggtatt	tatcgttagt	ttatcttaca	4140
tttattaatt	aaacatgtct	actattacct	gttatggaaa	tgacaaatct	agttatataa	4200
tttatgataa	aattaagata	ataataatga	aatcaaataa	ttatgtaaat	gctactagat	4260
tatgtgaatt	acgaggaaga	aagtttacga	actggaaaaa	attaagtga	tctaaaatat	4320
tagtcgataa	tgtaaaaaaa	ataaatgata	aaactaacca	gttaaaaaacg	gatatgatta	4380
tatacgttaa	ggatattgat	cataaaggaa	gagatacttg	cggttactat	gtacaccaag	4440
atctggtatc	ttctatatca	aattggatat	ctccgttatt	cgccgttaag	gtaaataaaa	4500
ttattaacta	ttatatatgt	aatgaatatg	atatacgact	tagcgaaatg	gaatctgata	4560
tgacagaagt	aatagatgta	gttgataaat	tagtaggagg	atacaatgat	gaaatagcag	4620
aaataatata	tttgtttaat	aaatctatag	aaaaatata	tgctaacata	tcgttatcaa	4680
ctgaattatc	tagtatatta	aataatctta	taaatcttaa	taaaaaacac	aataacgaca	4740
taaaagatat	taaatcttta	attcttgatc	tgaaaaacac	atctataaaa	ctagataaaa	4800
agttattcga	taaagataat	aatgaatcga	acgatgaaaa	attggaaaca	gaagttgata	4860
agctaatttt	ttcatctaa	atagttatt	tttattgaag	tacgaagttt	tacgtagat	4920
aaataataaa	ggtcgatctt	tattttgtta	aatatcaaat	atgtcattat	ctgataaaga	4980
tacaaaaaca	cacggtgatt	atcaaccatc	taacgaacag	atattacaaa	aaatacgtcg	5040
gactatggaa	aacgaagctg	atagocctca	tagaagaagc	attaaagaaa	ttggtttaga	5100
tgttatgaag	aattgggatc	atcctctcaa	cgaagaaata	gataaagttc	taaactggaa	5160
aatgatatac	ttaaacgatt	tagatcatct	aaatacagat	gataatatta	aggaaatcat	5220
acaatgtctg	attagagaat	ttgcgcttaa	aaagatcaat	tctattatgt	atagttatgc	5280
tatggtaaaa	ctcaattcag	ataacgaaac	attgaaagat	aaaattaagg	attatcttat	5340
agaaactatt	cttaaagaca	aacgtgggta	taaacaaaag	ccattaccct	agagcggccc	5400
ccaccgcggg	ggagctccag	cttttggtcc	cttttagtgag	ggttaatttc	gagcttggcg	5460

ES 2 541 551 T3

```

taatcatggt catagctggt tctgtgtga aattggtatc cgctcacaat tccacacaac 5520
atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca 5580
ttaattgctg tgcgctcact gcccgttttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat 5640
taatgaatcg gccaacgcgc ggggagagcc gggttgctga ttgggcgctc ttccgcttcc 5700
tcgctcactg actcgctcgc ctcggtcgtt cggtgcggc gagcggtatc agctcactca 5760
aaggcggtaa tacgggtatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 5820
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg 5880
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg 5940
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcgc ctctcctggt 6000
ccgacctcgc cgcttaccg atacctgtcc gcctttctcc cttegggaag cgtggcgctt 6060
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtag tcgttcgctc caagctgggc 6120
tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgctgcgcct tatecggtaa ctatcgtctt 6180
gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccacggg taacaggall 6240
agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga agtggtgccc taactacggc 6300
tacctagaa gacagattt tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctteggaaaa 6360
agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg ttttttgggt 6420
tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 6480
acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 6540
tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta aattaaaat gaagttttaa atcaatctaa 6600
agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 6660
tcagcgatct gtctatctcg ttcacctata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact 6720
acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc 6780
tcaccggctc cagatttata agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt 6840
ggctctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgcccggg agctagagta 6900
agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg catcgtgggtg 6960
tcacgctcgt cgttttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt 7020
acatgatccc ccatggtgtg caaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgctc 7080
agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggtatgg cagcactgca taattctctt 7140
actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc 7200
tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc 7260
gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa 7320
ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcaccaaac 7380
tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa 7440
aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttcctt 7500
tttcaatatt attgaagcat ttatcagggg tattgtctca tgagcggata catatttgaa 7560
tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccac 7618
<210> 3

```

ES 2 541 551 T3

- <211> 4885
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 5 <223> secuencia nucleotídica del inserto del plásmido pJY1394.1
<220>
<221> secuencia parcial del plásmido de clonación que comprende la secuencia del cebador M13F
<222> (1)..(53)
<220>
- 10 <221> secuencia del "brazo izquierdo2 que flanquea el locus de inserción F8 en el genoma del vector TROVAC
fowlpox.
<222> (54)..(1483)
<220>
<221> secuencia de unión entre el brazo y el promotor H6
- 15 <222> (1484)..(1568)
<220>
<221> secuencia del promotor H6 del virus de la viruela de la vaca
<222> (1569)..(1692)
<220>
- 20 <221> secuencia del gen sintético modificado HA de la cepa A/chicken/Indonesia/7/03
<222> (1693)..(3387)
<220>
<221> secuencia de unión entre el gen HA y el brazo derecho
<222> (3388)..(3414)
- 25 <223> secuencia que comprende una secuencia TTTTAT de detención de transcripción de los genes precoces del
fowlpox
<220>
<221> secuencia del "brazo derecho" que flanquea el locus de inserción F8 en el genoma del vector TROVAC
fowlpox
- 30 <222> (3415)..(4790)
<220>
<221> secuencia parcial del plásmido de clonación que comprende la secuencia del cebador M13R
<222> (4791)..(4885)
<400> 3

ES 2 541 551 T3

gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gggcgaattg ggtgaccott	60
tacaagaata aaagaagaaa caactgtgaa atagtttata aatgtaattc gtatgcagaa	120
aacgataata tattttggta tgagaaatct aaaggagaca tagtttgat agacatgcgc	180
tcttccgatg agatattoga tgcttttcta atgtatcata tagctacaag atatgcctat	240
catgatgatg atatatatct acaaatagtg ttatattatt ctaataatca aatgttata	300
tcttatatta cgaaaaataa atacgttaag tatataagaa ataaaactag agacgatatt	360
cataaagtaa aaatattagc tctagaagac tttacaacgg aagaaatata ttgttgatt	420
agtaatatat aacagcgtag ctgcacgggt ttgatcattt tccaacaata taaaccaatg	480
aaggaggacg actcatcaaa cataaataac attcacggaa aatattcagt atcagattta	540
tcacaagatg attatgttat tgaatgtata gacggatctt ttgattcgat caagtataga	600
gatataaagg ttataataat gaagaataac ggttacgta attgtagtaa attatgtaa	660
atgcggaata aatacltttc tagatggttg cgtctttcta cttctaaagc attattagac	720
atttacaata ataagtcagt agataatgct attgttaaag tctatgglaa aggtaagaaa	780
cttattataa caggatttta tctcaacaa aatatgatac gttatgttat tgagtggata	840
ggggatgatt ttacaaacga tatatacaaa atgattaatt tctataatgc gttattcgggt	900
aacgatgaat taaaaatagt atcctgtgaa aacactctat gcccgttat agaacttgggt	960
agatgctatt atggtaaaaa atgtaagtat atacacggag atcaatgtga tatctgtgggt	1020
ctatatatac tacaccctac cgatattaac caacgagttt ctcaacaaga aacttgttta	1080
gtagatagag attccttgat tgtgtttaaa agaagtacca gtaaaaagtg tggcatatgc	1140
atagaagaaa taaacaaaa acatatttcc gaacagtatt ttggaattct cccaagttgt	1200
aaacatattt ttgacctatc atgtataaga cgttgggcag atactaccag aaatacagat	1260
actgaaaata cgtgtcctga atgtagaata gtttttcctt tcataatacc cagtaggtat	1320
tggatagata ataaatatga taaaaaata ttatataata gatataagaa aatgattttt	1380
acaaaaatac ctataagaac aataaaaaata taattacatt tacggaaaat agctggtttt	1440
agtttaccaa cttagagtaa ttatcatatt gaatctatat tgctaattag ctaataaaaa	1500
cccgggttaa ttaattagtc atcaggcagg gcgagaacga gactatctgc tcgttaatta	1560
attagagctt ctttattcta tacttaaaaa gtgaaaataa atacaaagggt tcttgagggt	1620
tgtgttaaat tgaaagcgag aaataatcat aaattatttc attatcgcga tatccgtaa	1680
gtttgtatcg taatggagaa aatcgtgctg ctgctggcca tcgtgagcct ggtgaaaagc	1740
gatcagatct gcacgggcta ccacgccaac aacagcacag agcaagtgga cacaatcatg	1800
gaaaagaacg tgaccgtgac acacgccag gacatcctgg aaaagacaca caacgggaag	1860

ES 2 541 551 T3

ctgtgcatc tggatggagt gaagcctctg atcctgagag attgcagcgt ggccggatgg	1920
ctgctgggga acccaatgtg cgacgaattc atcaacgtgc ccgaatggag ctacatcgtg	1980
gagaaggcca acccagccaa cgacctgtgc taccagggga acctgaacga ctacgaagaa	2040
ctgaaacacc tgetgagcag aatcaaccac tttgagaaaa tccagatcat ccccaaaagc	2100
agctggtccg atcacgaagc cagcagcggg gtgagcagcg cctgccata ccagggaag	2160
tccagctttt ttagaaacgt ggtgtggctg atcaaaaaga acagcgccta cccaacaatc	2220
aagagaagct acaacaacac caaccaggaa gatctgctgg tgetgtgggg gatccaccac	2280
cctaacgatg ccgccgagca gacaaggctg taccagaacc caaccaccta catctcgtg	2340
gggacaagca cactgaacca gagactggtg caaaaaatcg ccatcagatc caaagtgaac	2400
gggcagagcg gaagaatgga gttcttctgg acaatcctga aaccaacga tgccatcaac	2460
ttcgagagca acggaaactt catcgcccca gaatacgcct acaaaatcgt gaagaaaggg	2520
gacagccca tcatgaaaag cgaactggaa tacggcaact gcaacaccaa gtgccagacc	2580
ccaatggggg ccatcaacag cagcatgcca ttccacaaca tccaccctct gaccatcggg	2640
gaatgcccc aatacgtgaa aagcaacaga ctggtgctgg ccaccgggct gagaaacagc	2700
cctcagagag agaccagagg actgtttgga gccatgcgg gctttatcga gggaggatgg	2760
cagggaatgg tggatggctg gtacggatac caccacagca acgagcaggg gagcggatac	2820
gccgccgaca aagaatccac ccagaaggcc atcgacggcg tgaccaacaa agtgaacagc	2880
atcatcgaca aatgaacac ccagtttgag gccgtgggaa gggagttaa caacctggaa	2940
aggagaatcg agaactgaa caagaagatg gaggacggat tcctggatgt gtggacctac	3000
aacgccgaac tgetggtgct gatggaaaac gagagaacct tggactttca cgacagcaac	3060
gtgaagaacc tgtacgacaa agtgaggctg cagctgaggg ataacgcaa ggagctgggc	3120
aacggctgct tcgagttcta ccacaaatgc gataacgaat gcatggaaag catcagaaac	3180
ggaacctaca actaccccc gtacagcga gaagccagac tgaaaagaga agaatctcc	3240
ggagtgaac tggaatccat cggaaacctac cagatcctga gcatctacag cacagtggcc	3300
tcctccctgg ccctggccat catgatggcc ggactgagcc tgtggatgtg ctccaacgga	3360
agcctgcagt gcagaatctg catctgactc gagttttat tgactagtta atcataagat	3420
aaataatata cagcattgta accatcgtca tccgttatac ggggaataat attaccatac	3480
agtattatta aattttctta cgaagaatat agatcggat ttatcgttag tttattttac	3540
atttattaat taaacatgtc tactattacc tgttatggaa atgacaaatt tagttatata	3600
atttatgata aaattaagat aataataatg aaatcaaata attatgtaa tgctactaga	3660

ES 2 541 551 T3

ttatgtgaat tacgaggaag aaagtttacg aactggaaaa aattaagtga atctaaaata	3720
ttagtcgata atgtaaaaaa aataaatgat aaaactaacc agttaaaaac ggatatgatt	3780
atatacgtta aggatattga tcataaagga agagatactt gcggttacta tgtacaccaa	3840
gatctggat cttctatatac aaattggata tctccggtat tcgccgttaa ggtaaataaa	3900
attattaact attatatatg taatgaatat gatatacgac ttagcgaaat ggaatctgat	3960
atgacagaag taatagatgt agttgataaa ttagtaggag gatacaatga tgaaatagca	4020
gaaataatat atttgtttaa taaatttata gaaaaatata ttgctaacat atcgttatca	4080
actgaattat ctagtatatt aaataatfff ataaatffta ataaaaata caataacgac	4140
ataaaagata ttaaactcttt aattcttgat ctgaaaaaca catctataaa actagataaa	4200
aagttattcg ataaagataa taatgaatcg aacgatgaaa aattggaaac agaagttgat	4260
aagctaattt tttcatcta aatagtatta ttttattgaa gtacgaagtt ttacgtaga	4320
taaataataa aggtcgattt ttatfffgtt aaatatcaaa tatgtcatta tctgataaag	4380
atacaaaaac acacggtgat tatcaacat ctaacgaaca gatattacaa aaaatacgtc	4440
ggactatgga aaacgaagct gatagcctca atagaagaag cattaagaa attggttag	4500
atgttatgaa gaattgggat catcctctca acgaagaat agataaagtt ctaaactgga	4560
aaaatgatac attaaacgat ttagatcatc taaatacaga tgataatatt aaggaaatca	4620
tacaatgtct gattagagaa tttgcgttta aaaagatcaa ttctattatg tatagttatg	4680
ctatggtaaa actcaattca gataacgaaa cattgaaaga taaaattaag gattatffta	4740
tagaaactat tcttaaagac aaacgtggtt ataaacaaaa gccattacc tagagcggcc	4800
gccaccgagg tggagctcca gctfffgttc cctfftagtga gggftaatff cgagcttggc	4860
gtaatcatgg tcatagctgt ttcct	4885

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción del virus de la gripe según el cual:
- 5 a. se administra a unas gallinas una vacuna contra la gripe,
b. se recogen los huevos de gallinas vacunadas,
c. se activa el proceso de embriogénesis,
10 d. se infectan los huevos embrionados inoculando un virus de la gripe en la cavidad alantoica,
e. se incuban los huevos embrionados infectados en condiciones de temperatura y de humedad que permiten la replicación del virus, y
15 f. se extrae el líquido alantoico que contiene el virus.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, según el cual la vacuna protege las gallinas contra la gripe aviar.
- 20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, según el cual la vacuna contra la gripe comprende en su composición la hemaglutinina de un virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína.
- 25 4. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, según el cual la composición de la vacuna contra la gripe contiene un virus de la gripe completo e inactivado.
5. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, según el cual la composición de la vacuna contra la gripe contiene un producto derivado de un virus de la gripe completo.
- 30 6. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual la composición de la vacuna contiene además un adyuvante.
7. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, según el cual la composición de la vacuna contra la gripe contiene un virus de la gripe atenuado.
- 35 8. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, según el cual la vacuna contra la gripe comprende un vector que comprende un gen que codifica para la hemaglutinina de un virus de la gripe.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, según el cual este vector es un poxvirus.
- 40 10. Un procedimiento según la reivindicación 8 o 9, según el cual el vector comprende también un gen que codifica para la neuraminidasa de un virus de la gripe.
- 45 11. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 10, según el cual la composición de la vacuna contiene además un adyuvante.
12. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 11, según el cual la hemaglutinina del virus de la gripe está en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína, contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas tienen unos subtipos diferentes.
- 50 13. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 11, según el cual la hemaglutinina del virus de la gripe está en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína, contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas tienen el mismo subtipo.
- 55 14. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 11, según el cual la hemaglutinina del virus de la gripe está en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas son idénticas.
- 60 15. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 4, 6 o 7, según el cual el virus de la gripe contenido en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas es idéntico al virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas.
- 65 16. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 15, según el cual la hemaglutinina del virus de la gripe

en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se administra a las gallinas y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de las gallinas vacunadas tienen el subtipo H5, H6, H7 o H9.

- 5 17. Un procedimiento según la reivindicación 16, según el cual la hemaglutinina del virus de la gripe en forma de proteína y/o de gen que codifica para esta proteína contenida en la composición de la vacuna que se utiliza para vacunar las gallinas contra la gripe y la hemaglutinina del virus de la gripe que se utiliza para infectar la cavidad alantoica de los huevos embrionados de gallinas vacunadas tienen el subtipo H5 o H7.
- 10 18. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende una etapa suplementaria de purificación del virus.
- 15 19. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende una etapa suplementaria de inactivación del virus.
- 20 20. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe.
21. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe humana pandémica.
- 25 22. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe humana epidémica.
23. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de la gripe en los équidos, los suidos, los cánidos, los félidos, los mustélidos y las especies aviares.
- 30 24. Utilización de huevos de gallinas vacunadas contra la gripe para la producción de un virus de la gripe.
25. Utilización de huevos de gallinas vacunadas contra la gripe para la producción de una vacuna contra la gripe.
- 35 26. Utilización de huevos de gallinas vacunadas contra la gripe según la reivindicación 24 o 25, según la cual los huevos contienen unos anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina del virus de la gripe.
27. Utilización según la reivindicación 26, según la cual los anticuerpos están dirigidos contra la hemaglutinina del virus de la gripe que tiene el subtipo H5, H6, H7 o H9.

ES 2 541 551 T3

FIGURA 1/2

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aattttggtt aaatcagctc 60
 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
 gataggggtg agtgttgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
 caactgcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
 ctaatcaagt ttttggggtt cgaggtgccc taaagcacta aatcgggaacc ctaaagggag 300
 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggggaagaa 360
 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
 cacacccgcc gcgcttaatg cgcgcctaca gggcgcgctc cattcgccat tcagggtgcg 480
 caactgttgg gaagggcgat cgggtcggggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
 gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
 taaaacgacg gccagtgaaat tgtaatacga ctactatag ggcaattgg gtgacccttt 660
 acaagaataa aagaagaaac aactgtgaaa tagtttataa atgtaattcg tatgcagaaa 720
 acgataatat attttggtat gagaaatcta aaggagacat agtttgtata gacatgcgct 780
 ctccgatga gatattcgat gcttttctaa tgtatcatat agctacaaga tatgcctatc 840
 atgatgatga tatatatcta caaatagtgt tatattattc taataatcaa aatgttatat 900
 cttatattac gaaaaataaa tacgttaagt atataagaaa taaaactaga gacgatattc 960
 ataaagtaaa aatattagct ctagaagact ttacaacgga agaaatataat tgttggatta 1020
 gtaatataata acagcgtagc tgcacggttt tgatcatttt ccaacaatat aaaccaatga 1080
 aggaggacga ctcatcaaac ataaataaca ttcacggaaa atattcagta tcagatttat 1140
 cacaagatga ttatgttatt gaatgtatag acggatcttt tgattcgatc aagtatagag 1200
 atataaaggt tataataatg aagaataacg gttacgttaa ttgtagtaaa ttatgtaaaa 1260
 tgcggaataa atacttttct agatgggtgc gtctttctac ttctaaagca ttattagaca 1320
 tttacaataa taagtcagta gataatgcta ttgttaaagt ctatggtaaa ggtaagaaac 1380
 ttattataac aggattttat ctcaaacaaa atatgatagc ttatgttatt gagtggatag 1440
 gggatgattt taaaaacgat atatacaaaa tgattaattt ctataatgcg ttattcggta 1500
 acgatgaatt aaaaatagta tcctgtgaaa acactctatg cccgtttata gaacttggta 1560
 gatgctatta tggtaaaaaa tgtaagtata tacacggaga tcaatgtgat atctgtggtc 1620
 tatatatact acaccctacc gatattaacc aacgagtttc tcacaagaaa acttgtttag 1680
 tagatagaga ttctttgatt gtgttttaaaa gaagtaccag taaaaagtgt ggcataatgca 1740

ES 2 541 551 T3

tagaagaaat aaacaaaaa catatttccg aacagtatth ttgaattctc ccaagttgta	1800
aacatatttt ttgcctatca tgtataagac gttgggcaga tactaccaga aatacagata	1860
ctgaaaatac gtgtcctgaa tgtagaatag tttttccttt cataataccc agtaggtatt	1920
ggatagataa taaatgat aaaaaaatat tatataatag atataagaaa atgattttta	1980
caaaaatacc tataagaaca ataaaaatat aattacattt acggaaaata gctggtttta	2040
gtttaccaac ttagagtaat tatcatattg aatctatatt gctaattagc taataaaaaac	2100
ccgggttaat taattagtca tcaggcaggg cgagaacgag actatctgct cgttaattaa	2160
ttagagcttc tttattctat acttaaaaag tgaaaataaa tacaaaggtt cttgaggggt	2220
gtgttaaatt gaaagcgaga aataatcata aattatttca ttatcgcgat atccgttaag	2280
tttgtatcgt aatggagaaa atcgtgctgc tgcgtgccat cgtgagcctg gtgaaaagcg	2340
atcagatctg catcggctac cacgccaca acagcacaga gcaagtggac acaatcatgg	2400
aaaagaacgt gaccgtgaca cacgcccagg acatcctgga aaagacacac aacgggaagc	2460
tgtgcatct ggatggagtg aagcctctga tcctgagaga ttgcagcgtg gccgatggc	2520
tgtggggaa cccaatgtgc gacgaattca tcaacgtgcc cgaatggagc tacatcgtgg	2580
agaaggccaa cccagccaac gaacctgtct acccagggaa cctgaacgac tacgaagaac	2640
tgaaacacct gctgagcaga atcaaccact ttgagaaaat ccagatcacc cccaaaagca	2700
gctggtccga tcacgaagcc agcagcggag tgagcagcgc ctgccatac cagggaaagt	2760
ccagcttttt tagaaacgtg gtgtggctga tcaaaaagaa cagcgcctac ccaacaatca	2820
agagaagcta caacaacacc aaccaggaag atctgctggt gctgtggggg atccaccacc	2880
ctaacgatgc cgccgagcag acaaggctgt accagaaccc aaccacctac atctccgtgg	2940
ggacaagcac actgaaccag agactggtgc caaaaatcgc catcagatcc aaagtgaacg	3000
ggcagagcgg aagaatggag ttcttctgga caatcctgaa acccaacgat gccatcaact	3060
tcgagagcaa cgaaaacttc atcgcccag aatacgccta caaaatcgtg aagaaagggg	3120
acagcgccat catgaaaagc gaactggaat acggcaactg caacaccaag tgccagacc	3180
caatgggggc catcaacagc agcatgccat tccacaacat ccacctctg accatcgggg	3240
aatgccccaa atacgtgaaa agcaacagac tgggtctggc caccgggctg agaaacagcc	3300
ctcagagaga gaccagagga ctgtttgag ccacgcggg ctttatcgag ggaggatggc	3360
aggaatggt ggatggctgg tacggatacc accacagcaa cgagcagggg agcggatacg	3420
ccgccgaaa agaattccacc cagaaggcca tcgacggcgt gaccaacaaa gtgaacagca	3480
tcatcgaaa aatgaacacc cagtttgagg ccgtgggaag ggagtttaac aacctgaaa	3540

ES 2 541 551 T3

ggagaatcga gaacctgaac aagaagatgg aggacggatt cctggatgtg tggacctaca 3600
 acgccgaact gctggtgctg atggaaaacg agagaaccct ggactttcac gacagcaacg 3660
 tgaagaacct gtacgacaaa gtgaggctgc agctgagggg taacgccaaag gagctgggca 3720
 acggctgctt cgagttctac cacaaatgcg ataacgaatg catggaaagc atcagaaaacg 3780
 gaacctacaa ctacccccag tacagcgaag aagccagact gaaaagagaa gaaatctccg 3840
 gagtgaaact ggaatccatc ggaacctacc agatcctgag catctacagc acagtggcct 3900
 cctccctggc cctggccatc atgatggccg gactgagcct gtggatgtgc tccaacggaa 3960
 gcctgcagtg cagaatctgc atctgactcg agtttttatt gactagttaa tcataagata 4020
 aataatatac agcattgtaa ccatcgtcat ccgttatacg gggaataata ttaccataca 4080
 gtattattaa attttcttac gaagaatata gatcggattat tatcgttagt ttattttaca 4140
 tttattaatt aaacatgtct actattacct gttatggaaa tgacaaattt agttatataa 4200
 tttatgataa aattaagata ataataatga aatcaaataa ttatgtaa gctactagat 4260
 tatgtgaatt acgaggaaga aagtttacga actggaaaaa attaatgaa tctaaaatat 4320
 tagtgcataa tgtaaaaaaa ataatgata aaactaacca gttaaaaaacg gatatgatta 4380
 tatacgtaa ggatattgat cataaaggaa gagatacttg cggttactat gtacaccaag 4440
 atctggtatc ttctatatca aattggatat ctccgttatt cgccgttaag gtaaataaaa 4500
 ttattaacta ttatatatgt aatgaatatg atatacgact tagcgaatg gaatctgata 4560
 tgacagaagt aatagatgta gttgataaat tagtaggagg atacaatgat gaaatagcag 4620
 aaataatata tttgtttaat aaatztatag aaaaatatat tgctaacata tcgttatcaa 4680
 ctgaattatc tagtatatta aataatttta taaattttaa taaaaaac aataacgaca 4740
 taaaagatat taaatcttta attcttgatc tgaaaaacac atctataaaa ctagataaaa 4800
 agttattcga taaagataat aatgaatcga acgatgaaaa attggaaaca gaagttgata 4860
 agctaatttt tttcatctaa atagtattat tttattgaag tacgaagttt tacgtagat 4920
 aaataataaa ggtcgatttt tattttgtta aatatcaaat atgtcattat ctgataaaga 4980
 tacaaaaaca cacggtgatt atcaaccatc taacgaacag atattacaaa aaatacgtcg 5040
 gactatggaa aacgaagctg atagcctcaa tagaagaagc attaaagaaa ttgttgtaga 5100
 tgttatgaag aattgggatc atcctctcaa cgaagaata gataaagttc taaactggaa 5160
 aatgataca ttaaacgatt tagatcatct aaatacagat gataatatta aggaaatcat 5220
 acaatgtctg attagagaat ttgcgtttaa aaagatcaat tctattatgt atagttatgc 5280
 tatggtaaaa ctcaattcag ataacgaac attgaaagat aaaattaagg attattttat 5340

ES 2 541 551 T3

```

agaaactatt cttaaagaca aacgtgggta taacaaaaag ccattaccct agagcggccg 5400
ccaccgcggt ggagctccag cttttgttcc ctttagtgag ggttaatttc gagcttggcg 5460
taatcatggt catagctggt tcctgtgtga aattgttata cgctcacaat tccacacaac 5520
atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggacct aatgagtgag ctaactcaca 5580
ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttcc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat 5640
taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc 5700
tcgctcaactg actcgtcgtg ctcggtcgtt cggtcgggc gagcgggtatc agctcaactca 5760
aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 5820
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg 5880
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaacccg 5940
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcgg ctctcctggt 6000
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt 6060
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 6120
tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 6180
gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt 6240
agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc 6300
tacctagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa 6360
agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt 6420
tgcaagcagc agattacggc cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 6480
acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 6540
tcaaaaagga tottcaccta gatcctttta aattaaaat gaagttttaa atcaatctaa 6600
agtatatatg agtaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 6660
tcagcgtctt gtctatttcc ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact 6720
acgatacggg aggttttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccggc agaccacgc 6780
tcaccggctc agattttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt 6840
ggctctgcaa cttttatcgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta 6900
agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggttcca ttgctacagg catcgtgggtg 6960
tcacgctcgt cgtttggtat ggtttcattc agctccgggt cccaacgata aaggcgagtt 7020
acatgatccc ccattgtgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc gatcgtttgc 7080
agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt 7140

```

ES 2 541 551 T3

actgtcatgc	catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggtg	agtactcaac	caagtcattc	7200
tgagaatagt	gtatgcggcg	accgagttgc	tcttgcccgg	cgtaatacgy	ggataatacc	7260
gcgccacata	gcagaacttt	aaaagtgctc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	7320
ctctcaagga	tcttaccgct	gttgagatcc	agttcgatgt	aaccactcg	tgcaccaaac	7380
tgatcttcag	catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaac	aggaaggcaa	7440
aatgccgcaa	aaaaggggat	aagggcgaca	cggaaatggt	gaatactcat	actcttcctt	7500
tttcaatatt	attgaagcat	ttatcagggt	tattgtctca	tgagcgata	catatttgaa	7560
tgtatttaga	aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccac	7618

FIGURA 2/2

M13F

1	GTAAAACGAC	GGCCAGTGAA	TTGTAATACG	ACTCACTATA	GGGCGAATTG
	CATTTTGCTG	CCGGTCACTT	AACATTATGC	TGAGTGATAT	CCCGCTTAAC
51	GGTGACCCTT	TACAAGAATA	AAAGAAGAAA	CAACTGTGAA	ATAGTTTATA
	CCACTGGGAA	ATGTTCTTAT	TTTCTTCTTT	GTTGACACTT	TATCAAATAT
101	AATGTAATTC	GTATGCAGAA	AACGATAATA	TATTTTGGTA	TGAGAAATCT
	TTACATTAAG	CATACGTCTT	TTGCTATTAT	ATAAAACCAT	ACTCTTTAGA
151	AAAGGAGACA	TAGTTTGTAT	AGACATGCGC	TCTTCCGATG	AGATATTCGA
	TTTCTCTGT	ATCAAACATA	TCTGTACGCG	AGAAGGCTAC	TCTATAAGCT
201	TGCTTTTCTA	ATGTATCATA	TAGCTACAAG	ATATGCCTAT	CATGATGATG
	ACGAAAAGAT	TACATAGTAT	ATCGATGTTC	TATACGGATA	GTACTACTAC
251	ATATATATCT	ACAAATAGTG	TTATATTATT	CTAATAATCA	AAATGTTATA
	TATATATAGA	TGTTTATCAC	AATATAATAA	GATTATTAGT	TTTACAATAT
301	TCTTATATTA	CGAAAAATAA	ATACGTTAAG	TATATAAGAA	ATAAACTAG
	AGAATATAAT	GCTTTTTTATT	TATGCAATTC	ATATATTCTT	TATTTTGATC
351	AGACGATATT	CATAAAGTAA	AAATATTAGC	TCTAGAAGAC	TTIACAACGG
	TCTGCTATAA	GTATTCATT	TTTATAATCG	AGATCTTCTG	AAATGTTGCC
401	AAGAAATATA	TTGTTGGATT	AGTAATATAT	AACAGCGTAG	CTGCACGGTT
	TTCTTTATAT	AACAACCTAA	TCATTATATA	TTGTGCGATC	GACGTGCCAA
451	TTGATCATTT	TCCAACAATA	TAAACCAATG	AAGGAGGACG	ACTCATCAAA
	AAC TAGTAAA	AGGTTGTTAT	ATTTGGTTAC	TTCTCCTGCG	TGAGTAGTTT
501	CATAAATAAC	ATTCACGGAA	AATATTCAGT	ATCAGATTTA	TCACAAGATG
	GTATTTATTG	TAAGTGCCTT	TTATAAGTCA	TAGTCTAAAT	AGTGTTCTAC
551	ATTATGTTAT	TGAATGTATA	GACGGATCTT	TTGATTGATG	CAAGTATAGA
	TAATACAATA	ACTTACATAT	CTGCCTAGAA	AACTAAGCTA	GTTTATATCT
601	GATATAAAGG	TTATAATAAT	GAAGAATAAC	GGTTACGTTA	ATTGTAGTAA
	CTATATTTCC	AATATTATTA	CTTCTTATTG	CCAATGCAAT	TAACATCATT
651	ATTATGTAAA	ATGCGGAATA	AATACTTTTC	TAGATGGTTG	CGTCTTTCTA
	TAATACATTT	TACGCCTTAT	TTATGAAAAG	ATCTACCAAC	GCAGAAAGAT
701	CTTCTAAAGC	ATTATTAGAC	ATTTACAATA	ATAAGTCAGT	AGATAATGCT
	GAAGATTTCC	TAATAATCTG	TAAATGTTAT	TATTCAGTCA	TCTATTACGA
751	ATTGTTAAAG	TCTATGGTAA	AGGTAAGAAA	CTTATTATAA	CAGGATTTTA
	TAACAATTTT	AGATACCATT	TCCATTCTTT	GAATAATATT	GTCCTAAAAT
801	TCTCAAACAA	AATATGATAC	GTTATGTTAT	TGAGTGGATA	GGGGATGATT
	AGAGTTTGTT	TTATACTATG	CAATACAATA	ACTCACCTAT	CCCCTACTAA

ES 2 541 551 T3

851 TTACAAACGA TATATACAAA ATGATTAATT TCTATAATGC GTTATTCGGT
AATGTTTGCT ATATATGTTT TACTAATTAA AGATATTACG CAATAAGCCA

901 AACGATGAAT TAAAAATAGT ATCCTGTGAA AACACTCTAT GCCCGTTTAT
TTGCTACTTA ATTTTTATCA TAGGACACTT TTGTGAGATA CGGGCAAATA

951 AGAACTTGGT AGATGCTATT ATGGTAAAAA ATGTAAGTAT ATACACGGAG
TCTTGAACCA TCTACGATAA TACCATTTTT TACATTCATA TATGTGCCTC

1001 ATCAATGTGA TATCTGTGGT CTATATATAC TACACCCTAC CGATATTAAC
TAGTTACACT ATAGACACCA GATATATATG ATGTGGGATG GCTATAATTG

1051 CAACGAGTTT CTCACAAGAA AACTTGTTTA GTAGATAGAG ATTCTTTGAT
GTTGCTCAAA GAGTGTTCCT TTGAACAAAT CATCTATCTC TAAGAAACTA

1101 TGTGTTTTAA AGAAGTACCA GTAAAAAGTG TGGCATATGC ATAGAAGAAA
ACACAAATTT TCTTCATGGT CATTTTTTAC ACCGTATACG TATCTTCTTT

1151 TAAACAAAAA ACATATTTCC GAACAGTATT TTGGAATTCT CCCAAGTTGT
ATTTGTTTTT TGTATAAAGG CTTGTCATAA AACCTTAAGA GGGTCAACA

1201 AAACATATTT TTTGCCTATC ATGTATAAGA CGTTGGGCAG ATACTACCAG
TTTGTATAAA AAACGGATAG TACATATTCT GCAACCCGTC TATGATGGTC

1251 AAATACAGAT ACTGAAAATA CGTGTCTGA ATGTAGAATA GTTTTTCCCT
TTTATGTCTA TGACTTTTAT GCACAGGACT TACATCTTAT CAAAAAGGAA

1301 TCATAATACC CAGTAGGTAT TGGATAGATA ATAAATATGA TAAAAAATA
AGTATTATGG GTCATCCATA ACCTATCTAT TATTTATACT ATTTTTTTAT

1351 TTATATAATA GATATAAGAA AATGATTTTT ACAAAAATAC CTATAAGAAC
AATATATTAT CTATATTCTT TACTAAAAA TGTTTTTATG GATATTCTTG

1401 AATAAAAATA TAATFACATT TACGGAAAAT AGCTGGTTTT AGTTTACCAA
TTATTTTTAT ATTAATGTAA ATGCCTTTTA TCGACCAAAA TCAAATGGTT

1451 CTTAGAGTAA TTATCATATT GAATCTATAT TGCTAATTAG CTAATAAAAA
GAATCTCATT AATAGTATAA CTTAGATATA ACGATTAATC GATTATTTTT

1501 CCCGGGTTAA TTAATTAGTC ATCAGGCAGG GCGAGAACGA GACTATCTGC
GGGCCCAATT AATTAATCAG TAGTCCGTCC CGCTCTTGCT CTGATAGACG

1551 TCGTTAATTA ATTAGAGCTT CTTTATTCTA TACTTAAAAA GTGAAAATAA
AGCAATTAAT TAATCTCGAA GAAATAAGAT ATGAATTTTT CACTTTTATT

1601 ATACAAAGGT TCTTGAGGGT TGTGTTAAAT TGAAAGCGAG AAATAATCAT
TATGTTTCCA AGAACTCCCA ACACAATTTA ACTTTCGCTC TTTATTAGTA

1651 AAATTATTTT ATTATCGCGA TATCCGTTAA GTTTGTATCG TAATGGAGAA
TTTAATAAAG TAATAGCGCT ATAGGCAATT CAAACATAGC ATTACCTCTT

. I V L L L A I V S L V K S D Q I C .

ES 2 541 551 T3

1701 AATCGTGCTG CTGCTGGCCA TCGTGAGCCT GGTGAAAAGC GATCAGATCT
 TTAGCACGAC GACGACCGGT AGCACTCGGA CCACTTTTCG CTAGTCTAGA

.. I G Y H A N N S T E Q V D T I M

1751 GCATCGGCTA CCACGCCAAC AACAGCACAG AGCAAGTGGG CACAATCATG
 CGTAGCCGAT GGTGCGGTTG TTGTCGTGTC TCGTTCACCT GTGTTAGTAC

E K N V T V T H A Q D I L E K T H .

1801 GAAAAGAACG TGACCGTGAC ACACGCCAG GACATCCTGG AAAAGACACA
 CTTTCTTGC ACTGGCACTG TGTGCGGGTC CTGTAGGACC TTTTCTGTGT

. N G K L C D L D G V K P L I L R D .

1851 CAACGGGAAG CTGTGCGATC TGGATGGAGT GAAGCCTCTG ATCCTGAGAG
 GTTGCCCTTC GACACGCTAG ACCTACCTCA CTTCGGAGAC TAGGACTCTC

.. C S V A G W L L G N P M C D E F

1901 ATTGCAGCGT GGCCGGATGG CTGCTGGGGA ACCCAATGTG CGACGAATTC
 TAACGTCGCA CCGGCCTACC GACGACCCCT TGGGTTACAC GCTGCTTAAG

I N V P E W S Y I V E K A N P A N .

1951 ATCAACGTGC CCGAATGGAG CTACATCGTG GAGAAGGCCA ACCCAGCCAA
 TAGTTGCACG GGCTTACCTC GATGTAGCAC CTCTTCCGGT TGGGTCGGTT

. D L C Y P G N L N D Y E E L K H L .

2001 CGACCTGTGC TACCCAGGGA ACCTGAACGA CTACGAAGAA CTGAAACACC
 GCTGGACACG ATGGGTCCCT TGGACTTGCT GATGCTTCTT GACTTTGIGG

.. L S R I N H F E K I Q I I P K S

2051 TGCTGAGCAG AATCAACCAC TTTGAGAAAA TCCAGATCAT CCCCAAAAGC
 ACGACTCGTC TTAGTTGGTG AAACCTTTTT AGGTCTAGTA GGGGTTTTTCG

S W S D H E A S S G V S S A C P Y .

2101 AGCTGGTCCG ATCACGAAGC CAGCAGCGGA GTGAGCAGCG CCTGCCATA
 TCGACCAGGC TAGTGCTTCG GTCGTCGCTT CACTCGTCGC GGACGGGTAT

. Q G K S S F F R N V V W L I K K N .

2151 CCAGGGAAAAG TCCAGCTTTT TTAGAAACGT GGTGTGGCTG ATCAAAAAGA
 GGTCCCTTTC AGGTCGAAAA AATCTTTGCA CCACACCGAC TAGTTTTTCT

.. S A Y P T I K R S Y N N T N Q E

2201 ACAGCGCCTA CCCAACAAATC AAGAGAAGCT ACAACAACAC CAACCAGGAA
 TGTCGCGGAT GGGTTGTTAG TTCTCTTCGA TGTTGTTGTG GTTGGTCTTT

D L L V L W G I H H P N D A A E Q .

2251 GATCTGTGGG TGCTGTGGGG GATCCACCAC CCTAACGATG CCGCCGAGCA
 CTAGACGACC ACGACACCCC CTAGGTGGTG GGATTGCTAC GGCGGCTCGT

. T R L Y Q N P T T Y I S V G T S T .

2301 GACAAGGCTG TACCAGAACC CAACCACCTA CATCTCCGTG GGGACAAGCA
 CTGTTCCGAC ATGGTCTTGG GTTGGTGGAT GTAGAGGCAC CCCTGTTCGT

.. L N Q R L V P K I A I R S K V N

2351 CACTGAACCA GAGACTGGTG CCAAAAATCG CCATCAGATC CAAAGTGAAC
 GTGACTTGGT CTCTGACCAC GGTTTTTAGC GGTAGTCTAG GTTTCACTTG

ES 2 541 551 T3

G Q S G R M E F F W T I L K P N D .
 2401 GGGCAGAGCG GAAGAATGGA GTTCTTCTGG ACAATCCTGA AACCCAACGA
 CCCGTCTCGC CTTCTTACCT CAAGAAGACC TGTTAGGACT TTGGGTTGCT

 . A I N F E S N G N F I A P E Y A Y .
 2451 TGCCATCAAC TTCGAGAGCA ACGGAAACTT CATCGCCCCA GAATACGCCT
 ACGGTAGTTG AAGCTCTCGT TGCCTTTGAA GTAGCGGGGT CTTATGCGGA

 .. K I V K K G D S A I M K S E L E
 2501 ACAAATCGT GAAGAAAGGG GACAGCGCCA TCATGAAAAG CGAACTGGAA
 TGTTTTAGCA CTTCTTTCCC CTGTTCGCGGT AGTACTTTTC GCTTGACCTT

 Y G N C N T K C Q T P M G A I N S .
 2551 TACGGCAACT GCAACACCAA GTGCCAGACC CCAATGGGGG CCATCAACAG
 ATGCCGTTGA CGTTGTGGTT CACGGTCTGG GGTACCCCC GGTAGTTGTC

 . S M P F H N I H P L T I G E C P K .
 2601 CAGCATGCCA TTCCACAACA TCCACCCTCT GACCATCGGG GAATGCCCCA
 GTCGTACGGT AAGGTGTTGT AGGTGGGAGA CTGGTAGCCC CTTACGGGGT

 .. Y V K S N R L V L A T G L R N S
 2651 AATACGTGAA AAGCAACAGA CTGGTGCTGG CCACCGGGCT GAGAAACAGC
 TTATGCACCT TTCGTTGTCT GACCACGACC GGTGGCCCGA CTCTTTGTGC

 P Q R E T R G L F G A I A G F I E .
 2701 CCTCAGAGAG AGACCAGAGG ACTGTTTGGG GCCATCGCCG GCTTTATCGA
 GGAGTCTCTC TCTGGTCTCC TGACAAACCT CGGTAGCGGC CGAAATAGCT

 . G G W Q G M V D G W Y G Y H H S N .
 2751 GGGAGGATGG CAGGGAATGG TGGATGGCTG GTACGGATAC CACCACAGCA
 CCCTCCTACC GTCCCTTACC ACCTACCGAC CATGCCTATG GTGGTGTCTG

 .. E Q G S G Y A A D K E S T Q K A
 2801 ACGAGCAGGG GAGCGGATAC GCCGCCGACA AAGAATCCAC CCAGAAGGCC
 TGCTCGTCCC CTCGCCTATG CGGCGGCTGT TTCTTAGGTG GGTCTTCCGG

 I D G V T N K V N S I I D K M N T .
 2851 ATCGACGGCG TGACCAACAA AGTGAACAGC ATCATCGACA AAATGAACAC
 TAGCTGCCGC ACTGTTGTT TCACTTGTCG TAGTAGCTGT TTTACTTGTG

 . Q F E A V G R E F N N L E R R I E .
 2901 CCAGTTTGGAG GCCGTGGGAA GGGAGTTTAA CAACCTGGAA AGGAGAATCG
 GGTCAAACCT CGGCACCCTT CCCTCAAATT GTTGACCTT TCCTCTTAGC

 .. N L N K K M E D G F L D V W T Y
 2951 AGAACCTGAA CAAGAAGATG GAGGACGGAT TCCTGGATGT GTGACCTAC
 TCTTGACTT GTTCTTCTAC CTCCTGCCTA AGGACCTACA CACCTGGATG

 N A E L L V L M E N E R T L D F H .
 3001 AACGCCGAAC TGCTGGTGCT GATGGAAAAC GAGAGAACCC TGGACTTTCA
 TTGCGGCTTG ACGACCACGA CTACCTTTTG CTCTCTTGGG ACCTGAAAGT

 . D S N V K N L Y D K V R L Q L R D .

ES 2 541 551 T3

3051 CGACAGCAAC GTGAAGAACC TGTACGACAA AGTGAGGCTG CAGCTGAGGG
GCTGTCGTTG CACTTCTTGG ACATGCTGTT TCACTCCGAC GTCGACTCCC

.. N A K E L G N G C F E F Y H K C

3101 ATAACGCCAA GGAGCTGGGC AACGGCTGCT TCGAGTTCTA CCACAAATGC
TATTGCGGTT CCTCGACCCG TTGCCGACGA AGCTCAAGAT GGTGTTTACG

D N E C M E S I R N G T Y N Y P Q

3151 GATAACGAAT GCATGGAAAAG CATCAGAAAC GGAACCTACA ACTACCCCCA
CTATTGCTTA CGTACCTTTC GTAGTCTTTG CCTTGGATGT TGATGGGGGT

. Y S E E A R L K R E E I S G V K L

3201 GTACAGCGAA GAAGCCAGAC TGAAAAGAGA AGAAATCTCC GGAGTGAAAC
CATGTCGCTT CTTGGTCTG ACTTTTCTCT TCTTTAGAGG CCTCACTTTC

.. E S I G T Y Q I L S I Y S T V A

3251 TGGAATCCAT CGGAACCTAC CAGATCCTGA GCATCTACAG CACAGTGGCC
ACCTTAGGTA GCCTTGGATG GTCTAGGACT CGTAGATGTC GTGTCACCGG

S S L A L A I M M A G L S L W M C

3301 TCCTCCCTGG CCCTGGCCAT CATGATGGCC GGACTGAGCC TGTGGATGTG
AGGAGGGACC GGGACCGGTA GTACTACCGG CCTGACTCGG ACACCTACAC

. S N G S L Q C R I C I *

3351 CTCCAACGGA AGCCTGCAGT GCAGAATCTG CATCTGACTC GAGTTTTTAT
GAGGTTGCCT TCGGACGTCA CGTCTTAGAC GTAGACTGAG CTCAAAAATA

3401 TGACTIONGTTA ATCATAAGAT AAATAATATA CAGCATTGTA ACCATCGTCA
ACTGATCAAT TAGTATTCTA TTTATTATAT GTCGTAACAT TGGTAGCAGT

3451 TCCGTTATAC GGGGAATAAT ATTACCATAC AGTATTATTA AATTTTCTTA
AGGCAATATG CCCCTTATTA TAATGGTATG TCATAATAAT TTAAAAGAAT

3501 CGAAGAATAT AGATCGGTAT TTATCGTTAG TTTATTTTAC ATTTATTAAT
GCTTCTTATA TCTAGCCATA AATAGCAATC AAATAAAATG TAAATAATTA

3551 TAAACATGTC TACTATTACC TGTTATGGAA ATGACAAATT TAGTTATATA
ATTTGTACAG ATGATAATGG ACAATACCTT TACTGTTTAA ATCAATATAT

3601 ATTTATGATA AAATTAAGAT AATAATAATG AAATCAAATA ATTATGTA
TAAATACTAT TTTAATTCTA TTATTATTAC TTTAGTTTAT TAATACATTT

3651 TGCTACTAGA TTATGTGAAT TACGAGGAAG AAAGTTTACG AACTGGAAAA
ACGATGATCT AATACACTTA ATGCTCCTTC TTTCAAATGC TTGACCTTTT

3701 AATTAAGTGA ATCTAAAATA TTAGTCGATA ATGTAAAAAA AATAAATGAT
TTAATTCACT TAGATTTTAT AATCAGCTAT TACATTTTTT TTATTTACTA

3751 AAAACTAACC AGTTAAAAAC GGATATGATT ATATACGTTA AGGATATTGA
TTTTGATTGG TCAATTTTTG CCTATACTAA TATATGCAAT TCCTATAACT

3801 TCATAAAGGA AGAGATACTT GCGGTTACTA TGTACACCAA GATCTGGTAT
AGTATTTTCT TCTCTATGAA CGCCAATGAT ACATGTGGTT CTAGACCATA

ES 2 541 551 T3

3851 CTTCTATATC AAATTGGATA TCTCCGTTAT TCGCCGTTAA GGTAATAAAA
GAAGATATAG TTTAACCTAT AGAGGCAATA AGCGGCAATT CCATTTATTT

3901 ATTATTAACT ATTATATATG TAATGAATAT GATATACGAC TTAGCGAAAT
TAATAATTGA TAATATATAC ATTACTTATA CTATATGCTG AATCGCTTTA

3951 GGAATCTGAT ATGACAGAAG TAATAGATGT AGTTGATAAA TTAGTAGGAG
CCTTAGACTA TACTGTCTTC ATTATCTACA TCAACTATTT AATCATCCTC

4001 GATACAATGA TGAATAGCA GAAATAATAT ATTTGTTTAA TAAATTTATA
CTATGTTACT ACTTTATCGT CTTTATTATA TAAACAAAT ATTTAAATAT

4051 GAAAAATATA TTGCTAACAT ATCGTTATCA ACTGAATTAT CTAGTATATT
CTTTTTATAT AACGATTGTA TAGCAATAGT TGACTTAATA GATCATATAA

4101 AAATAATTTT ATAAATTTTA ATAAAAAATA CAATAACGAC ATAAAAGATA
TTTATTAAAA TATTTAAAAAT TATTTTTTAT GTTATTGCTG TATTTTCTAT

4151 TTAATCTTTT AATTCTTGAT CTGAAAAACA CATCTATAAA ACTAGATAAA
AATTTAGAAA TTAAGAACTA GACTTTTTGT GTAGATATTT TGATCTATTT

4201 AAGTTATTCTG ATAAAGATAA TAATGAATCG AACGATGAAA AATTGGAAAC
TTCAATAAGC TATTTCTATT ATTACTTAGC TTGCTACTTT TTAACCTTTG

4251 AGAAGTTGAT AAGCTAATTT TTTTCATCTA AATAGTATTA TTTTATTGAA
TCTTCAACTA TTCGATTAAA AAAAGTAGAT TTATCATAAT AAAATAAECT

4301 GTACGAAGTT TTACGTTAGA TAAATAATAA AGGTCGATTT TTATTTTGT
CATGCTTCAA AATGCAATCT ATTTATTATT TCCAGCTAAA AATAAAACAA

4351 AAATATCAAA TATGTCATTA TCTGATAAAG ATACAAAAAC ACACGGTGAT
TTTATAGTTT ATACAGTAAT AGACTATTTT TATGTTTTTG TGTGCCACTA

4401 TATCAACCAT CTAACGAACA GATATTACAA AAAATACGTC GGAATATGGA
ATAGTTGGTA GATTGCTTGT CTATAATGTT TTTTATGCAG CCTGATACCT

4451 AAACGAAGCT GATAGCCTCA ATAGAAGAAG CATTAAAGAA ATTGTTGTAG
TTTGCTTCGA CTATCGGAGT TATCTTCTTC GTAATTTCTT TAACAACATC

4501 ATGTTATGAA GAATTGGGAT CATCCTCTCA ACGAAGAAAT AGATAAAGTT
TACAATACTT CTTAACCCTA GTAGGAGAGT TGCTTCTTTA TCTATTTCAA

4551 CTAAACTGGA AAAATGATAC ATTAAACGAT TTAGATCATC TAAATACAGA
GATTTGACCT TTTTACTATG TAATTTGCTA AATCTAGTAG ATTTATGTCT

4601 TGATAATATT AAGGAAATCA TACAATGTCT GATTAGAGAA TTTGCGTTTA
ACTATTATAA TTCCTTTAGT ATGTTACAGA CTAATCTCTT AAACGCAAAAT

4651 AAAAGATCAA TTCTATTATG TATAGTTATG CTATGGTAAA ACTCAATTCA
TTTTCTAGTT AAGATAATAC ATATCAATAC GATACCATTT TGAGTTAAGT

4701 GATAACGAAA CATTGAAAGA TAAAATTAAG GATTATTTTA TAGAAACTAT
CTATTGCTTT GTAACCTTCT ATTTTAATTC CTAATAAAAT ATCTTTGATA

ES 2 541 551 T3

4751 TCTTAAAGAC AAACGTGGTT ATAAACAAAA GCCATTACCC TAGAGCGGCC
AGAATTTCTG TTTGCACCAA TATTTGTTTT CGGTAATGGG ATCTCGCCGG

4801 GCCACCGCGG TGGAGCTCCA GCTTTTG TTC CCTTTAGTGA GGGTTAATTT
CGGTGGCGCC ACCTCGAGGT CGAAAAACAAG GGAAATCACT CCCAATTAAA

4851 CGAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCCT
GCTCGAACCG CATTAGTACC AGTATCGACA AAGGA
M13R