

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 056**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2006** **E 06826264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 1937301**

54 Título: **Partículas funcionales similares al virus de la gripe (VPL)**

30 Prioridad:

18.10.2005 US 727513 P

10.03.2006 US 780847 P

15.05.2006 US 800006 P

17.07.2006 US 831196 P

21.07.2006 US 832116 P

19.09.2006 US 845495 P

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**NOVAVAX, INC. (100.0%)
9920 BELWARD CAMPUS DRIVE
ROCKVILLE MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, GALE;
BRIGHT, RICK;
PUSHKO, PETER;
ZHANG, JINYOU y
MAHMOOD, KUTUB**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 056 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

Partículas funcionales similares al virus de la gripe (VPL)

5 Antecedentes de la invención

El virus de la gripe es un miembro de la familia Orthomyxoviridae (para una revisión, véase Murphy y Webster, 1996). Hay tres subtipos de virus de gripe que se han designado A, B, y C. El virión de la gripe contiene un genoma ARN segmentado en sentido negativo. El virión de la gripe incluye las siguientes proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), matriz (M1), proteína del canal ion protón (M2), nucleoproteína (NP), proteína 1 básica polimerasa (PB1), proteína 2 básica polimerasa (PB2), proteína ácida polimerasa (PA), y proteína 2 no estructural (NS2). Las HA, NA, M1 y M2 están asociadas a la membrana, mientras que NP, PB1, PB2, PA, y NS2 son proteínas asociadas a la nucleocápside. La NS1 es la única proteína no estructural que no se asocia con partículas de virión sino que es específica de las células infectadas con gripe. La proteína M1 es la proteína más abundante en las partículas de gripe. Las proteínas HA y NA son glucoproteínas de la envoltura, responsables de la unión y penetración de las partículas víricas en la células, y fuentes de los epítomos inmunodominantes principales para la neutralización vírica y la inmunidad protectora. Tanto las proteínas HA como NA se consideran los componentes más importantes para las vacunas profilácticas de gripe.

La infección por virus de la gripe se inicia por la unión de la proteína HA de la superficie del virión a un receptor celular que contiene ácido siálico (glucoproteínas y glucolípidos). La proteína NA interviene en el proceso del receptor de ácido siálico, y la penetración del virus en la célula depende de la endocitosis mediada por receptor dependiente de HA. En los confines ácidos de los endosomas internalizados que contienen un virión de gripe, la proteína HA se somete a cambios conformacionales que dan lugar a la fusión de las membranas de la células huésped y vírica seguidos por la pérdida de recubrimiento y la liberación mediada por M2 de las proteínas M1 de las ribonucleoproteínas asociadas con la nucleocápside (RNP), que migra en el núcleo de la célula para la síntesis vírica. Los anticuerpos contra la molécula HA evita la infección vírica neutralizando la infectividad del virus, mientras que los anticuerpos contra las proteínas NA producen su efecto en las etapas tempranas de la replicación vírica.

Las vacunas de virus de gripe A y B tienen licencia actualmente como vacunas trivalentes para administración parenteral. Estas vacunas trivalentes se producen como volumen monovalente en la cavidad alantoidea de embriones de pollo, se purifican por tasa de centrifugación zonal o cromatografía en columna, se inactivan con formalina o β -propiolactona, y se formulan como una mezcla de las dos cepas de tipo A y la cepa de tipo B de los virus de gripe en circulación entre la población humana en un año determinado. Las vacunas comerciales disponibles de gripe son vacunas víricas de virus entero (WV) o subviriones (SV; antígeno de superficie fraccionado o purificado). La vacuna de WV contiene viriones intactos, inactivados. Las vacunas SV que se tratan con disolventes tales como tri-n-butil-fosfato (Flu-Shield, Wyeth-Lederle) contienen casi todas las proteínas víricas estructurales y algunas de las envolturas víricas. Las vacunas SV solubilizadas con Triton X-100 (Fluzone, Sanofi-Aventis; Fluvirin, Novartis) contienen principalmente agregados de monómeros HA, NA, y NP, aunque están presentes cantidades residuales de otras proteínas víricas estructurales. Recientemente se concedió la aprobación de comercialización de una vacuna vírica atenuada adaptada al frío por la FDA para su uso comercial como una vacuna de suministro intranasal indicada para la inmunización activa y la prevención de la enfermedad producida por los virus de gripe A y B en niños sanos y adolescentes, de 5-17 años de edad y adultos sanos de 18-49 años de edad.

Se han desarrollado varios productos recombinantes como candidatos de vacunas de gripe recombinantes. Estas estrategias se dirigen a la expresión, producción y purificación de proteínas HA y NA de virus gripe tipo A, incluyendo la expresión de estas proteínas utilizando células de insecto infectadas por baculovirus (Crawford *et al.*, 1999; Johansson, 1999; Treanor *et al.*, 1996), vectores víricos (Pushko *et al.*, 1997; Berglund *et al.*, 1999), y construcciones de vacuna ADN (Olsen *et al.*, 1997).

Crawford *et al.* (1999) han demostrado que la HA de gripe expresada en células de insecto infectadas con baculovirus es capaz de evitar la enfermedad de gripe letal causada por los subtipos de gripe aviar H5 y H7. Al mismo tiempo, otro grupo ha demostrado que las proteínas HA y NA de gripe expresada por baculovirus inducen respuestas inmunitarias superiores en animales que las inducidas por una vacuna convencional (Johansson *et al.*, 1999). La inmunogenicidad y eficacia de la hemaglutinina del virus de gripe equina que se expresa por baculovirus se comparó con un candidato de vacuna ADN homóloga (Olsen *et al.*, 1997). En conjunto, los datos demostraban que se puede inducir un alto grado de protección contra la exposición al virus de gripe con proteínas HA y NA recombinantes, utilizando varias estrategias experimentales y en diferentes modelos animales.

Lakey *et al.* (1996) demostraron que una vacuna de HA de virus de gripe derivada de baculovirus era bien tolerada e inmunogénica en voluntarios humanos en un estudio de seguridad de dosis escalada en Fase I. Sin embargo, los resultados de los estudios en Fase II realizados en varios sitios clínicos en voluntarios vacunados con varias dosis de vacunas de gripe que comprendían proteínas HA y/o NA indicaban que las vacunas de subunidades proteicas recombinantes no producían una inmunidad protectora [G. Smith, Protein Sciences; M. Perdue, USDA, Personal Communications]. Estos resultados indicaban que los epítomos conformacionales presentados en la superficie de

peplómeros HA y NA de viriones infecciosos eran importantes en la producción de anticuerpos neutralizantes e inmunidad protectora.

Con respecto a la inclusión de otras proteínas del virus de la gripe en los candidatos de vacunas recombinantes de gripe, se llevaron a cabo varios estudios, incluyendo los experimentos que implicaban la nucleoproteína del virus de la gripe, NP, sola o en combinación con proteína M1 (Ulmer *et al.*, 1993; Ulmer *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1995; Tsui *et al.*, 1998). Estos candidatos de vacunas, que estaba compuestos de proteínas internas de virión casi invariables, producían una inmunidad de amplio espectro que era primariamente celular (tanto células T CD4⁺ como CD8⁺ de memoria) Estos experimentos implicaban el uso de los vectores genéticos víricos o ADN. Se necesitaban cantidades relativamente grandes de ADN inyectado, ya que los resultados de los experimentos con dosis bajas de ADN indicaban poca o ninguna protección (Chen *et al.*, 1998). Además, se pueden necesitar más investigaciones preclínicas y clínicas para evaluar si tales estrategias basadas en ADN que implican la NP y M1 de la gripe son seguras, eficaces, y persistentes.

Recientemente, en un intento para desarrollar vacunas más eficaces para la gripe, se utilizaron proteínas particuladas como vehículos de epítopos de proteína M2. El razonamiento para el desarrollo de una vacuna basada en M2 era que en estudios animales la inmunidad protectora contra la gripe se producía por proteínas M2 (Slepushkin *et al.*, 1995). Neirynck *et al.* (1999) utilizaron un dominio transmembrana de 23 aa como pareja de fusión aminoterminal con el antígeno central del virus de la hepatitis B (HBcAg) para exponer el epítipo M2 en la superficie de partículas tipo cápside de HBcAg. Sin embargo, a pesar del hecho de que tanto la proteína M2 de longitud completa como VLP M2-HBcAg inducían anticuerpos detectables y protección en ratones, era improbable que se basaran vacunas de gripe en el futuro basadas exclusivamente en la proteína M2, ya que la proteína M2 estaba presente en un bajo número de copias por virión, era débilmente antigénica, era incapaz de producir anticuerpos que se unieran a los viriones de gripe libres, y era incapaz de bloquear la unión del virus a los receptores celulares (es decir, neutralización del virus).

Aunque la investigación previa ha demostrado que las glucoproteínas de superficie del virus de gripe, HA y NA, son las primeras dianas para la producción de inmunidad protectora contra el virus de la gripe y que M1 proporciona una diana conservada por inmunidad células contra la gripe, un nuevo candidato puede incluir estos antígenos víricos como una partícula proteica macromolecular, tal como partículas similares a virus (VLP). Además, la partícula con estos antígenos de gripe pueden presentar epítopos conformacionales que produzcan anticuerpos neutralizantes contra múltiples cepas de virus de gripe.

Varios estudios han demostrado que las proteínas de virus de la gripe recombinantes podrían auto ensamblarse en VLP en cultivo celular utilizando plásmidos de expresión en mamíferos o vectores de baculovirus (Gomez-Puertas *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2000; Latham y Galarza, 2001). Gomez-Puertas *et al.* (1999) demostraron que la formación eficaz de VLP de gripe depende de los niveles de expresión de las proteínas víricas. Neumann *et al.* (2000) estableció un sistema basado en plásmido de expresión en mamíferos para generar partículas similares a virus de gripe infecciosas totalmente de ADNc clonados. Latham y Galarza (2001) comunicaron de la formación de VLP de gripe en células de insecto infectadas con baculovirus recombinante que co-expresaba genes HA, NA, M1 y M2. Estos estudios demostraban que las proteínas del virión de gripe puede auto ensamblarse en la co-expresión en células eucariotas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una partícula similar a virus (VLP) que comprende una proteína M1 del virus de la gripe y proteínas hemaglutininas (HA) y neuraminidasa (NA) del virus de gripe. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína M1 es al menos idéntica en un 98 % a la SEC ID N° 49, y la VLP se expresa a partir de una célula de insecto. Opcionalmente, dichas HA y NA son H5 y N1 respectivamente. En una realización, la proteína M1 se deriva de una cepa de virus de gripe diferente en comparación con proteínas H5 y N1. En otra realización, dicha H5 o N1 es del clado 1 del virus de gripe H5N1.

Dicha VLP puede producir anticuerpos neutralizantes en un ser humano o un animal que sean protectores contra la infección de gripe cuando se administra la VLP a dicho ser humano o animal.

La presente invención también proporciona una composición inmunógena que comprende una dosis eficaz de una VLP de la invención. En una realización, dicha composición comprende un adyuvante.

La presente invención también proporciona una vacuna que comprende una dosis eficaz de una VLP e la invención. En una realización, dicha vacuna comprende al menos una segunda VLP que comprende HA y NA de diferentes cepas de gripe. En otra realización, dicha vacuna comprende un adyuvante.

La presente invención también proporciona dicha vacuna para su uso en un método para inducir inmunidad sustancial contra la infección por virus de gripe en un animal, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una vacuna que comprende la VLP de la invención. En una realización, dicha vacuna se administra a un animal por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, o subcutánea.

La presente invención también proporciona el uso de una VLP de la invención para la preparación de una vacuna para un animal, en que la vacuna induce una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe en dicho animal.

- 5 La presente invención también proporciona un método para fabricar una VLP de la invención, que comprende la expresión de dichas proteínas M1, HA y NA en una célula de insecto.

La presente solicitud también describe una estructura proteica macromolecular que contiene (a) una primera proteína M1 del virus de gripe y (b) una proteína estructural adicional, que puede incluir una segunda o más proteínas M1 del virus de gripe; una primera, segunda o más proteína HA de virus de gripe; una primera, segunda o más proteína NA de virus de gripe; y una primera, segunda o más proteína M2 de virus de gripe. Si la proteína estructural adicional no es de una segunda o más proteína M1 de virus de gripe, entonces ambos o todos los miembros del grupo, por ejemplo, la primera y segunda proteínas M2 de virus de gripe están incluidas. Por tanto, se proporciona una estructura proteica funcional, que incluye una partícula subviral, VLP, o estructura de capsómero, o una parte de los mismos, una vacuna, una vacuna multivalente, y mezclas de los mismos que consisten esencialmente en proteínas estructurales del virus de gripe que se producen por el método de la invención. En una realización particularmente preferida, la estructura proteica macromolecular de gripe incluye proteínas HA, NA y M1 de virus de gripe que son los productos de expresión de genes del virus de gripe clonados como fragmentos sintéticos a partir de un virus tipo silvestre.

La estructura proteica macromolecular también puede incluir también puede incluir una proteína estructural adicional, por ejemplo, una nucleoproteína (NP), proteínas de membrana de especies distintas de virus no de gripe y una proteína de membrana de una fuente no de gripe, que se derivan de orígenes aviares o mamíferos y diferentes subtipos de virus de gripe, que incluye los virus de gripe subtipos A y B. La estructura proteica macromolecular puede incluir una estructura proteica macromolecular quimérica, que incluye una parte de al menos una proteína que tiene un resto no producido por el virus de gripe.

Se puede conseguir la prevención de la gripe proporcionando una estructura proteica macromolecular que se pueden auto-ensamblar en una célula huésped a partir de una construcción recombinante. La estructura proteica macromolecular de la invención tiene la capacidad de auto-ensamblarse en partículas similares a virus (VLP) homotípicas o heterotípicas que presentan epítopos conformacionales en proteínas HA y NA, que producen anticuerpos neutralizantes que son protectores. La composición puede ser una composición vacunal, que también contienen un vehículo o diluyente y/o un adyuvante. Las VLP de gripe funcionales producen anticuerpos neutralizantes contra una o más cepas o tipos de virus de gripe dependiendo de si las VLP de gripe funcionales contienen proteínas HA y/o NA de una o más cepas o tipos víricos. La vacuna puede incluir proteínas del virus de gripe que son proteínas del virus de gripe tipo silvestre. Preferentemente, las proteínas estructurales que contienen la VLP de gripe, o una parte de las mismas, se pueden derivar de varias cepas o de virus de gripe tipo silvestre. Las vacunas de gripe pueden administrarse a seres humanos o animales para producir inmunidad protectora contra una o más cepas o tipos de virus de gripe.

Las estructuras proteicas macromoleculares de la invención pueden mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa.

La solicitud describe un método para producir una VLP que se deriva de la gripe construyendo una construcción recombinante que codifica genes estructurales de gripe, incluyendo M1,

HA, y al menos una proteína estructural derivada del virus de la gripe. Una construcción recombinante que se utiliza para transfectar, infectar, o transformar una célula huésped adecuada con el baculovirus recombinante. La células huésped se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión de M1, HA y al menos una proteína estructural deriva del virus de gripe y la VLP se forma en la célula huésped. Los medios celulares infectados que contienen una VLP de gripe funcional se recolectan y se purifica la VLP. El método también presenta una etapa adicional de co-transfección, co-infección o co-transformación de la célula huésped con una segunda construcción recombinante que codifica una segunda proteína de gripe, incorporando de esta manera una segunda proteína de gripe en la VLP. Tales proteínas estructurales se pueden derivar del virus de gripe, incluyendo NA, M2 y NP, y al menos una proteína estructural que se deriva de orígenes aviares o de mamífero. La proteína estructural puede ser un virus de gripe de subtipo A y B. La célula huésped puede ser una célula eucariota. Además, la VLP puede ser una VLP quimérica.

La solicitud también describe un método para formular una sustancia farmacológica que contiene un VPL de gripe introduciendo construcciones recombinantes que codifican genes víricos de gripe en células huésped y permitiendo el auto-ensamblaje de las proteínas vírica recombinantes de gripe en una VLP homotípica o heterotípica en las células. La VLP de gripe se aísla y se purifica y se formula una sustancia farmacológica que contiene la VLP de gripe. La sustancia farmacológica puede incluir además un adyuvante. Además, la solicitud proporciona un método para formular un producto farmacológico, mezclando tal sustancia farmacológica que contiene una VLP de gripe con una vesícula lipídica, es decir, una vesícula lipídica no iónica. Por lo tanto, las VLP homotípicas y heterotípicas pueden aparecer como partículas envueltas a partir de las células infectadas. Las VLP de gripe que surgen se pueden aislar y purificar por ultracentrifugación o cromatografía en columna como sustancias farmacológicas y se

formulan solas o con adyuvantes tales como Novasomes®, un producto de Novavax, Inc., como productos farmacológicos tales como vacunas. Novasomes®, que proporciona un aumento del efecto inmunológico, se describe además en la Pat. de EE. UU. Nº 4.911.928.

5 La solicitud describe un método para detectar la inmunidad humoral contra la infección por el virus de la gripe en un vertebrado proporcionando un reactivo de ensayo que incluye una cantidad eficaz de detección de anticuerpo de proteína de virus de gripe que tiene al menos un epítipo conformacional de una estructura macromolecular del virus de gripe. El reactivo de ensayo se pone en contacto con una muestra de fluido corporal de un vertebrado que se va a examinar en cuanto a infección por virus de la gripe. Se permite que los anticuerpos específicos del virus de gripe
10 que contiene la muestra se unan al epítipo conformacional de una estructura macromolecular del virus de gripe para que formen complejos antígeno-anticuerpo. Los complejos se separan de complejos no unidos y se ponen en contacto con un agente de unión de inmunoglobulinas marcado detectablemente. Se determina la cantidad de agente de unión de inmunoglobulinas marcado detectablemente que está unido a los complejos.

15 El virus de gripe se puede detectar en un espécimen de un animal o ser humano sospechoso de estar infectado con el virus proporcionando anticuerpos, que tengan un marcador que produzca una señal detectable, o que estén unidos a un reactivo marcado detectablemente, que tienen especificidad contra al menos un epítipo conformacional de la partícula de virus de gripe. El espécimen se pone en contacto con anticuerpos y se permite que los anticuerpos se unan al virus de gripe. La presencia del virus de la gripe en el espécimen se determina por medio del marcador detectable.
20

La solicitud proporciona métodos para el tratamiento, prevención, y generación de una respuesta inmunitaria protectora administrando a un vertebrado una cantidad eficaz de la composición de la invención.

25 De manera alternativa, la sustancia farmacológica de VLP de gripe se puede formular como reactivos de laboratorio para estudios de la estructura del virus de gripe y ensayos de diagnóstico clínico. La solicitud también describe un kit para el tratamiento del virus de gripe administrando una cantidad eficaz de una composición de la invención e instrucciones para su uso.

30 La solicitud también describe una VLP que comprende proteínas HA, NA y M1 que se derivan del virus de gripe aviar que puede producir morbilidad y mortalidad en un vertebrado. Dichas proteína HA, NA y M1 se pueden derivar de un virus de gripe aviar tipo A. La HA se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y la NA se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9. Opcionalmente, dichas proteínas HA y NA son H5 y N1, respectivamente. De manera alternativa, dichas proteínas HA y NA son H9 y N2, respectivamente. Dicha HA y/o NA pueden mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente.

La VLP puede consistir esencialmente en proteínas HA, NA y M1, es decir, son sustancialmente las únicas proteínas de gripe en la VLP.
40

La solicitud también describe un método para producir una VLP, que comprende la transfección de vectores que codifican proteínas del virus de gripe aviar en células huésped adecuadas y la expresión de dichas proteínas de virus de gripe bajo condiciones que permitan que se formen las VLP.

45 Este método puede implicar la transfección de una célula huésped con moléculas de ADN recombinante que codifican solo las proteínas HA, NA y M1.

La solicitud también describe una formulación antigénica que comprende una VLP que comprende proteína HA, NA y M1 derivadas del virus de gripe aviar que puede producir morbilidad y mortalidad en un vertebrado. La HA se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y la NA se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9. Opcionalmente, dichas proteínas HA y NA son H5 y N1, respectivamente.

55 De manera alternativa, dichas proteínas HA y NA son H9 y N2, respectivamente.

Dicha formulación antigénica se puede administrar al sujeto por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, o subcutánea.

60 La solicitud proporciona además un método de vacunación de un vertebrado contra el virus de la gripe aviar que comprende la administración a dicho vertebrado una cantidad que induce protección de una VLP que comprende proteínas HA, NA y M1 derivadas de un virus de gripe aviar.

La presente solicitud también describe un método para inducir una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración al menos de una dosis eficaz de una VLP de gripe. Dicha VLP puede consistir esencialmente en HA, NA y M1. De manera alternativa
65

dicha VLP comprende proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en HA, NA y M1. Dicha HA y/o NA puede mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente.

5 La presente solicitud también describe un método para inducir una inmunidad sustancial contra la infección por virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe aviar. Dicha VLP de gripe puede consistir esencialmente en HA, NA y M1 aviar.

10 La presente solicitud describe además un método para inducir una inmunidad sustancial contra la infección por un virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe estacional. Dicha VLP de gripe puede consistir esencialmente en HA, NA y M1 estacionales.

15 La presente solicitud describe además un método para inducir una inmunidad sustancial contra la infección del virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de al menos una VLP de gripe estacional.

Dicha VLP de gripe puede comprender HA, NA y M1 de gripe estacional. De manera alternativa, dicha VLP de gripe puede consistir esencialmente en HA, NA y M1 de gripe estacional.

20 La presente solicitud describe además un método para inducir una respuesta de anticuerpos sustancialmente protectora contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe.

25 La presente solicitud describe un método para inducir una respuesta inmunitaria celular sustancialmente protectora contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe.

30 La presente solicitud describe además un método para formular una vacuna que induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma a un sujeto, que comprende la adición a dicha formulación de una dosis eficaz de VLP de gripe.

35 Dicha inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma se puede suministrar en una dosis. De manera alternativa, dicha inmunidad sustancial contra la infección por virus de gripe o al menos un síntoma de la misma se suministra en múltiples dosis.

40 La presente solicitud describe además una vacuna que comprende una VLP de gripe, en que dicha vacuna induce una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma cuando se administra a un sujeto. Opcionalmente, dicha VLP de gripe es una VLP de gripe aviar. De manera alternativa, dicha VLP de gripe es una VLP de gripe estacional.

45 La presente solicitud describe además una formulación antigénica que comprende una VLP de gripe, en que dicha vacuna induce una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma cuando se administra a un sujeto. Opcionalmente, dicha VLP de gripe es una VLP de gripe aviar. De manera alternativa, dicha VLP de gripe es una VLP de gripe estacional.

Breve descripción de los dibujos

50 La FIG. 1 representa la secuencia de nucleótidos del gen de la neuraminidasa (NA) del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEC ID N° 1).

La FIG. 2 representa la secuencia de nucleótidos del gen de la hemaglutinina (HA) del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEC ID N° 2).

La FIG. 3 representa la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de matriz M1 (M1) (SEC ID N° 3).

55 La FIG. 4 representa los vectores de transferencia para la construcción de baculovirus recombinantes para la expresión de las proteínas HA, NA y M1 del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). La FIG. 4A representa un vector de transferencia para la expresión de genes individuales y la FIG. 4B describe el vector de transferencia para la multi-expresión de genes.

La FIG. 5 describe la expresión de las proteínas HA, NA y M1 del virus de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en células Sf-9S.

60 La FIG. 6 describe la purificación de VLP de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) por el método de gradiente de densidad en sacarosa.

La FIG. 7 representa la detección de la proteína del virus de gripe por cromatografía de filtración en gel. Los anticuerpos que se utilizan en los análisis de transferencia de Western son los siguientes: (A) anti-H9N2 de conejo; (B) anti-M1 mAb murino; y (C) anti-BACgp64 murino.

65 La FIG. 8 representa la detección de las proteínas de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) incluyendo partículas sub-víricas, VLP, y complejos VLP, por microscopía electrónica.

La FIG. 9 representa la actividad de hemaglutinación de VLP de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)

purificadas.

La FIG. 10 representa la actividad neuraminidasa de VLP de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) purificadas.

La FIG. 11 representa la inmunización y el programa de extracción de sangre para el estudio de inmunogenicidad de gripe recombinante con VLP de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) purificadas en ratones.

La FIG. 12 representa los resultados de un estudio de inmunogenicidad en ratones inmunizados con VLP de H9N2 recombinante de gripe. La FIG. 12A representa los sueros de ratones BALB/c inmunizados con VLP recombinante que comprende proteínas HA, NA y M1 del virus de gripe aviar tipo A/Hong Kong/1073/99. La FIG. 12B representa los sueros de ratones blancos Nueva Zelanda inmunizados con un virus de gripe aviar inactivado tipo A H9N2 que se hicieron reaccionar con transferencias de Western que contenían virus de gripe aviar tipo A H9N2 inactivado (calles 1 y 3) o virus de gripe aviar adaptado al frío tipo A H9N2 (calles 2 y 4).

La FIG. 13 representa la media geométrica de las respuestas de anticuerpos en ratones BALB/c tras una inmunización primaria y secundaria.

La FIG. 14 representa las respuestas de inhibición de la aglutinación en el suero (HI) en ratones BALB/c.

La FIG. 15 representa la pérdida de peso (%) de los ratones BALB/c desafiados con gripe H9N2.

La FIG. 16 representa los títulos de virus pulmonares a los 3 y 5 días tras la exposición con H9N2.

Las FIG. 17A, 17B y 17C representan la respuesta de anticuerpo de los ratones al A/Fujian/411/2002 cuando se inmunizan con una VLP de H3N2.

Las FIG. 18A y B representan los isotipos de anticuerpo IgG en ratones.

La FIG. 19 respuestas de anticuerpos de inhibición de hemaglutinación (HI) en Ratas SD inmunizadas con vacuna VLP de H9N2.

Las FIG. 20A y 20B representan las respuestas de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación (HI) a diferentes dosis de VLP de H9N2 con y sin adyuvante en ratones BALB/c.

La FIG. 21 representa las respuestas de inhibición de la hemaglutinación (HI) en suero de ratones BALB/c entre diferentes dosis de VLP.

La FIG. 22 representa las respuestas de inhibición de la hemaglutinación (HI) en hurones.

La FIG. 23 representa las respuestas de inhibición de la hemaglutinación del suero extraído los días 21 y 42 de hurones tras la administración de diferentes cepas de VLP de H3N2.

La FIG. 24 representa el anticuerpo anti-HA (título de punto final de dilución) de ratones inoculados por vía intramuscular con VLP de H5N1 (Vietnam/1203/2003) a bajas dosis.

La FIG. 25 representa el anticuerpo anti-HA (título de punto final de dilución) de ratones inoculados por vía intranasal con VLP de H5N1 (Vietnam/1203/2003) a bajas dosis.

La FIG. 26 representa un ejemplo de fabricación, aislamiento y purificación de las VPL de la invención.

La FIG. 27 representa ratones inoculados con VLP de H3N2 por vía intramuscular y desafiados posteriormente por vía intranasal con virus A/Aichi/2/68x31 (H3N2).

La FIG. 28 representa ratones inoculados con VLP de H3N2 por vía intranasal y desafiados posteriormente por vía intranasal con virus A/Aichi/2/68x31 (H3N2).

La FIG. 29 representa la dispersión vírica en lavados nasales de hurones inoculados con una vacuna VLP de H9N2 y desafiados posteriormente por vía intranasal con virus H9N2.

Las FIG. 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F, 30G, 30H representan las respuestas de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HI) en ratones tras la inoculación con diferentes dosis de VLP de A/Fujian/411/2002 (H3N2) por vía intramuscular o intranasal ensayadas contra diferentes cepas H3N2 de virus de gripe.

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en el presente documento, el término "baculovirus" también conocido como baculoviridae, se refiere a una familia de virus ADN encapsulados de los artrópodos, algunos de cuyos miembros se pueden utilizar como vectores de expresión para producir proteínas recombinantes insertándose en cultivos celulares. El virión contienen una o más nucleocápsides en forma de barra que contienen una molécula de ADN bicatenaria superenrollada circular (Mr 54×10^6 - 154×10^6). El virus que se utiliza como vector es el virus de poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (NVP). La expresión de genes introducidos está bajo el control del fuerte promotor que regula normalmente la expresión del componente poliédrico de proteína de la gran inclusión nuclear en la que se embeben los virus en las células infectadas.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "derivado de" se refiere al origen o fuente, y puede incluir moléculas de origen natural, recombinantes, no purificadas o purificadas. Las proteínas y moléculas de la presente invención se pueden derivar de moléculas de gripe y de no gripe.

Como se utiliza en el presente documento el término "primer" proteína del virus de la gripe, es decir, una primera proteína M1 del virus de gripe, se refiere a una proteína, tal como M1, HA, NA, y M2, que se deriva de una cepa particular del virus de la gripe. La cepa o tipo del primer virus de gripe se diferencia de la cepa o tipo de la segunda proteína del virus de gripe, que es una cepa o tipo diferente de la primera proteína del virus de gripe.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "actividad hemaglutinina" se refiere a la capacidad de proteínas que contienen HA, VLP, o partes de las mismas que se unen y aglutinan glóbulos rojos (eritrocitos).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “actividad neuraminidasa” se refiere a la actividad enzimática de proteínas que contienen NA, VLP, o partes de las mismas para escindir restos de ácido siálico de sustratos que incluyen proteínas tales como la fetuina.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, el término “heterotípico” se refiere a uno o más tipos o cepas diferentes de virus.

Como se utiliza en el presente documento, el término “homotípico” se refiere a un tipo o cepa de virus.

- 10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “estructura proteica macromolecular” se refiere a una construcción o disposición de una o más proteínas.

Como se utiliza en el presente documento, el término vacuna “multivalente” se refiere a una vacuna contra múltiples tipos de cepas de virus de gripe.

- 15 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “no gripe” se refiere a una proteína o molécula que no se deriva del virus de gripe.

- 20 Como se utiliza en el presente documento, el término “vacuna” se refiere a una preparación de agentes patógenos muertos o debilitados, o de derivados de determinantes antigénicos, que se utilizan para inducir la formación de anticuerpos o inmunidad contra el agente patógeno. Una vacuna se da para proporcionar inmunidad contra la enfermedad, por ejemplo, gripe, que está producida por virus de gripe. La presente invención proporciona composiciones vacunales que son inmunogénicas y proporcionan protección. Además, el término “vacuna” se refiere también a una suspensión o solución de un inmunógeno (por ejemplo una VLP) que se administra a un vertebrado para producir inmunidad protectora, es decir, una inmunidad que reduce la gravedad de una enfermedad asociada con la infección.

- 30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “inmunidad sustancial” se refiere a una respuesta inmunitaria en la que cuando se administra las VLP de la invención a un vertebrado hay una inducción del sistema inmunitario en dicho vertebrado que da como resultado en la prevención de la infección de gripe, la mejoría de la infección de gripe o la reducción de al menos un síntoma relacionado con la infección del virus de gripe en dicho vertebrado. La sustancial inmunidad también se puede referir a un título de inhibición de la hemaglutinación (HI) de ≥ 40 en un mamífero en que se le ha administrado la VLP de la invención y se le ha inducido una respuesta inmunitaria.

- 35 Como se utiliza en el presente documento el término “adyuvante” se refiere a un compuesto que, cuando se utiliza en combinación con un inmunógeno específico (por ejemplo, una VLP) en una formulación, aumenta o altera o modifica de otra manera la respuesta inmunitaria resultante. La modificación de la respuesta inmunitaria incluye intensificación o amplificación de la especificidad de una o ambas respuestas inmunitarias de anticuerpos o celular.
- 40 La modificación de la respuesta inmunitaria también puede significar el descenso o supresión de ciertas respuestas inmunitarias específicas de antígeno.

- 45 Como se utiliza en el presente documento la expresión “estimulador inmunitario” se refiere a un compuesto que aumenta una respuesta inmunitaria por medio de los propios mensajeros químicos (citoquinas) del cuerpo. Estas moléculas comprenden varias citoquinas, linfocinas y quimioquinas con actividades inmunoestimulantes, inmunopotenciación, y pro-inflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM) (CSF)); y otras moléculas inmunoestimulantes, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimulantes se pueden administrar en la misma formulación que las VLP de gripe, o se pueden administrar por separado. O la proteína o el vector de expresión que codifica la proteína se puede administrar para producir un efecto inmunoestimulante.

- 50 Como se utiliza en el presente documento una “dosis eficaz” se refiere en general a una cantidad de la VLP de la invención suficiente para inducir inmunidad, para prevenir y/o mejorar la infección por el virus de la gripe o para reducir al menos un síntoma de infección por gripe y/o aumentar la eficacia de otra dosis de una VLP. Una dosis eficaz se puede referir a la cantidad de la VLP suficiente para retrasar o minimizar la aparición de una infección de gripe. Una dosis eficaz puede referirse también a la cantidad de la VLP que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de la infección de gripe. Además, una dosis eficaz es la cantidad con respecto a las VLP solas de la invención, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una infección vírica de gripe. Una dosis eficaz puede ser también la cantidad suficiente para aumentar la respuesta inmunitaria propia de un sujeto (por ejemplo, de un ser humano) contra una posterior exposición al virus de gripe. Se pueden controlar los niveles de inmunidad, por ejemplo, midiendo cantidades de anticuerpos neutralizantes segregados y/o del suero, por ejemplo, por neutralización de placas, fijación del complemento, inmunoabsorción ligado a enzimas, o ensayo de microneutralización. En el caso de una vacuna, una
- 65 “dosis eficaz” es la que previene la enfermedad o reduce la gravedad de los síntomas.

Como se utiliza en el presente documento la expresión “virus de gripe aviar” se refiere a virus de gripe que se encuentran principalmente en aves pero que también pueden infectar seres humanos u otros animales. En algunos casos, los virus de gripe aviar se pueden transmitir o diseminar de un ser humano a otro. Un virus de gripe aviar que infecta seres humanos tiene el potencial de producir una gripe pandémica, es decir, morbilidad y/o mortalidad en seres humanos. Una pandemia se produce cuando emerge una nueva cepa de virus de gripe (un virus para el que el ser humano no tiene inmunidad natural), diseminándose más allá de localidades individuales, posiblemente alrededor del globo, e infectando a muchos seres humanos al mismo tiempo.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “virus de gripe estacional” se refiere a cepas del virus de gripe que se ha determinado que pasan por la población humana durante una determinada estación de gripe, que se basa en la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo los Centros Nacionales de Gripe por todo el mundo. Estos estudios epidemiológicos, y algunos virus de gripe aislados, se envían a uno de los cuatro laboratorios de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de los cuales está en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta para los ensayos detallados. Estos laboratorios ensayan cómo los anticuerpos hacen a la presente vacuna que reaccione con el virus circulante y los nuevos virus de gripe. Esta información, junto con la información, sobre la actividad de la gripe, se resume y se presenta a un comité consultivo de la Administración de Alimentos y Fármacos de EE. UU (FDA) y en una reunión de la OMS. Estas reuniones da como resultado la selección de tres virus (dos subtipos de virus de gripe A y uno virus de gripe B) para introducirlos en las vacunas de gripe del siguiente otoño e invierno. La selección se produce en febrero para el hemisferio norte y en septiembre para el hemisferio sur. Habitualmente, uno o dos de las tres cepas de virus de la vacuna cambian cada año.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “respuesta de anticuerpos sustancialmente protectora” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por los anticuerpos contra un virus de gripe, que muestra un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora la infección de gripe o reduce al menos un síntoma de la misma. Las VLP de la invención pueden estimular la producción de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes, que bloquean la entrada de los virus de gripe en las células, bloquean la replicación de dichos virus de gripe uniéndose a los virus, y/o protegen las células huésped de la infección y destrucción.

Como se utiliza en el presente documento “respuesta celular sustancialmente protectora” se refiere a una sustancia inmunitaria que está mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos sanguíneos contra el virus de gripe, que muestra un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora una infección de gripe o reduce al menos un síntoma de la misma. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica al antígeno por células T citolíticas (“CTL”). Las CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que están presentes en asociación con proteínas codificadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y que se expresan en la superficie de las células. Las CTL ayudan a la inducción y promoción de la destrucción de microbios intracelulares, o la lisis las células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por las células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan ayudando a estimular la función, y el foco de actividad de células efectoras no específicas contra las células presentadoras de antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una “respuesta inmunitaria celular” también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras de tales moléculas que se producen por células T activadas y/u otros glóbulos blancos sanguíneos, incluyendo las que se derivan de células T CD4⁺ y CD8⁺.

Como se utiliza en el presente documento la expresión “inmunidad sustancial con una base poblacional amplia” se refiere a la inmunidad como resultado de las VLP de la invención que se administran a individuos de una población. La inmunidad en dicho individuo en dicha población da como resultado la prevención, mejora de la infección de gripe, o la reducción de al menos un síntoma relacionado con la infección por el virus de la gripe en dicho individuo, y previene la diseminación de dicho virus de gripe a otros de la población. El término población se define como un grupo de individuos (por ejemplo, escolares, ancianos, un país, un estado, etc.).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “formulación antigénica” o “composición antigénica” se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, especialmente un ave o un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria.

Como se utiliza en el presente documento, el término “vertebrado” o “sujeto” o “paciente” se refiere a cualquier miembro de un subphylum chordata, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos. Animales de granja tales como el ganado bovino, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores como los ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo las aves domésticas, silvestres y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares, como ejemplos no limitantes. Los términos “mamíferos” y “animales” están incluidos en esta definición. Se pretende incluir tanto los individuos adultos como los recién nacidos.

La gripe sigue siendo un problema de salud pública generalizado a pesar de la disponibilidad de vacunas específicas de virus inactivados que tienen una efectividad del 60-80 % bajo condiciones óptimas. Cuando estas vacunas son eficaces, habitualmente se evita la enfermedad previniendo la infección vírica. Puede producirse un fallo vacunal

como resultado de la acumulación de diferencias antigénicas (cambio antigénico y deriva antigénica). Por ejemplo, el virus de gripe aviar tipo A H9N2 co-circula con el virus de gripe humana tipo A Sydney/97 (H3N2) en cerdos y da lugar a una reordenación genética y la emergencia de nuevas cepas de virus de gripe humana con un potencial pandémico (Peiris et al., 2001). En el caso de tal cambio antigénico, es improbable que las vacunas actuales proporcionen una protección adecuada.

Otra razón para la insuficiencia de los programas de vacunación de gripe es la relativamente corta persistencia de la inmunidad producida por las vacunas actuales. Otra deficiencia de las medidas de control de gripe se refleja en el uso restringido de las vacunas actuales debido a la reactogenicidad de la vacuna y los efectos secundarios en niños menores, ancianos y personas con alergias a los componentes del huevo, que se usa en la fabricación de las vacunas de virus de gripe inactivado que tienen la licencia comercial.

De manera adicional, las vacunas de virus de gripe inactivado carecen a menudo o contienen epítomos conformacionales HA y NA alterados, que son los que producen anticuerpos neutralizantes y tienen un papel principal en la protección contra la enfermedad. Por lo tanto, las vacunas víricas inactivadas, así como algunas vacunas de subunidades proteicas de gripe monoméricas recombinantes, suministran una protección inadecuada. Por otro lado, las estructuras proteicas macromoleculares, tales como los capsómeros, partículas sub-víricas, y/o VLP, incluyen múltiples copias de proteínas nativas que muestran epítomos conformacionales, que son ventajosos para una inmunogenicidad vacunal óptima.

La presente solicitud describe la clonación de los genes HA, NA y M1 del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en un vector de expresión único de baculovirus solo o en tándem y la producción de candidatos o reactivos vacunales de gripe que comprenden proteínas estructurales recombinantes de gripe que se auto-ensamblan en estructuras proteicas macromoleculares homotípicas funcionales e inmunogénicas, incluyendo partículas sub-víricas de gripe y VLP de gripe, en células de insecto infectadas con baculovirus.

La presente solicitud describe la clonación de los genes HA, NA, M1, M2 y NP de los virus de gripe humana A/Sydney/5/97 y A/Fujian/411/2002 (H3N2) en vectores de expresión de baculovirus y la producción de candidatos o reactivos que comprenden proteínas estructurales de gripe que se auto-ensamblan en estructuras proteicas macromoleculares homotípicas inmunogénicas y funcionales, que incluyen partículas sub-víricas de gripe y VLP de gripe, en células de insecto infectadas con baculovirus.

Además la presente solicitud describe la clonación del gen HA del virus de la gripe humana A/Sydney/5/97 and A/Fujian/411/2002 (H3N2) y los genes HA, NA y M1 de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en un único vector de expresión de baculovirus en tándem y la producción de candidatos o reactivos de vacuna de gripe que comprende proteínas estructurales de gripe que se auto-ensamblan en estructuras macromoleculares heterotípicas inmunogénicas y funcionales, que incluyen partículas de gripe sub-víricas y VLP de gripe, en células de insecto infectadas con baculovirus.

VLP de la invención

Las VLP de gripe de la invención son útiles para preparar vacunas contra los virus de gripe. Una característica importante de este sistema es la capacidad para reemplazar las glucoproteínas de superficie con diferentes subtipos de HA y/o NA u otras proteínas víricas, permitiendo así, la actualización de nuevas variantes antigénicas de gripe cada año o para prepararlas frente a una gripe pandémica. Una vez que se identifican las variantes antigénicas de estas glucoproteínas, se pueden actualizar las VLP para incluir estas nuevas variantes (por ejemplo, para vacunas de gripe estacional). Además, las glucoproteínas de superficie de los virus potencialmente pandémicos tales como H5N1, u otras combinaciones de HA, NA con el potencial pandémico se podrían incorporar en VLP sin el problema de liberar genes que no habían circulado en humanos durante varias décadas. Esto es debido a que las VLP no son infecciosas, no se replican y no pueden producir la enfermedad. Por lo tanto, este sistema permite crear un nuevo candidato de vacuna de gripe cada año y/o una vacuna para gripe pandémica siempre que sea necesaria.

Hay 16 hemaglutininas (HA) diferentes y 9 neuraminidasas (NA) diferentes encontrándose todas ellas entre aves silvestres. Las aves silvestres son el reservorio natural primario para todos los tipos de virus de gripe A y se cree que son la fuente de todos los tipos de virus de gripe A en los demás vertebrados. Estos subtipos se diferencian por los cambios en la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) en su superficie. Son posibles muchas combinaciones diferentes de proteínas HA y NA. Cada combinación representa un tipo diferente de virus de gripe A. Además, cada tipo se puede clasificar en cepas basándose en las diferentes mutaciones que se encuentran en cada uno de sus 8 genes.

Todos los tipos conocidos de virus de gripe A se pueden encontrar en aves. Habitualmente los virus de gripe aviar no infectan a los seres humanos. Sin embargo, algunos virus de gripe aviar desarrollan variaciones genéticas asociadas con la capacidad de cruzar las barreras interespecíficas. Tal virus es capaz de producir una pandemia debido a que los seres humanos no tienen inmunidad natural contra el virus y puede diseminarse fácilmente de persona a persona. En 1997, el virus de gripe aviar saltó de un ave a un ser humano en Hong Kong durante un brote de gripe aviar en una granja. Este virus se identificó como un virus de gripe H5N1. El virus produjo enfermedad

respiratoria grave en 18 personas, seis de los cuales murieron. Desde entonces, se han producido muchos más casos de infecciones por H5N1 conocidas entre seres humanos por todo el mundo; aproximadamente la mitad de estas personas murieron.

Por lo tanto, la presente solicitud describe la clonación de nucleótidos HA, NA y M1 de los virus de gripe aviar, virus de gripe con potencial pandémico y/o virus de gripe estacional en vectores de expresión. La presente solicitud describe también la producción de candidatos o reactivos de vacuna de gripe compuestos por proteínas que se auto-ensamblan en VLP funcionales. Todas las combinaciones de proteínas víricas se deben co-expresar con un nucleótido M1.

Las VLP descritas en el presente documento consisten o comprenden proteínas HA, NA y M1.

Dicha VLP puede comprender una HA de un virus de gripe aviar, pandémico y/o estacional y una NA de un virus de gripe aviar, pandémico y/o estacional, en que dicha HA se selecciona de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y dicha NA se selecciona de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9. De manera alternativa, la VLP puede consistir esencialmente en HA, NA y M1. Dicha HA y NA puede ser de la lista anterior de HA y NA. Estas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. De manera alternativa, dicha VLP de gripe comprende proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en las proteínas HA, NA y M1. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA).

La HA y/o NA pueden mostrar actividad de hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente, cuando se expresan en la superficie de las VLP.

Dicha VLP puede comprender HA y NA del virus H5N1 y una proteína M1 (la proteína M1 puede ser o no de la misma cepa vírica).

De manera alternativa, dicha VLP puede consistir esencialmente en HA, NA del virus H5N1 y una proteína M1. Estas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. De manera alternativa, dicha VLP puede consistir en HA, NA del virus H5N1 y una proteína M1. Dicha VLP puede comprender proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en proteínas H5, N1 y M1. Estas VLP contienen H5, N9 y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, H5 y/o N1). La H5 y/o N1 pueden mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente, cuando se expresan en la superficie de las VLP.

Dicha VLP puede comprender la HA y NA del virus H9N2, y una proteína M1. De manera alternativa, dicha VLP puede consistir esencialmente en HA y NA del virus H9N2 y una proteína M1. Estas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. De manera alternativa, dicha VLP puede consistir en la HA y NA del virus H9N2 y una proteína M1. Dicha VLP de gripe puede comprender proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en H0, N2 y proteínas M1. Estas VLP contienen H9, N2 y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, H9 y/o N2). En otra realización la H9 y/o N2 pueden mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente, cuando se expresan en la superficie de las VLP.

También se describe en el presente documento una VLP que comprende la HA y NA del virus de la gripe B, y una proteína M1. Los virus de gripe B se encuentran habitualmente solo en seres humanos. A diferencia de los virus de gripe A, estos virus no se clasifican según un subtipo. Los virus de gripe B pueden causar morbilidad y mortalidad en seres humanos, pero se asocian en general con epidemias menos graves que con los virus de gripe A. Dicha VLP puede consistir esencialmente en la HA y NA del virus de gripe B, y una proteína M1. Estas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. De manera alternativa, dicha VLP de gripe puede comprender proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en proteínas HA, NA y M1. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA). De manera alternativa, dicha VLP consiste en HA y NA del virus de gripe B, y una proteína M1.

La HA y/o NA pueden mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente, cuando se expresan en la superficie de las VLP.

También se describen en el presente documento variantes de dichas proteínas de gripe que se expresan sobre o en las VLP de la invención. Las variantes pueden contener alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas que las constituyen. El término "variante" con respecto a un polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácidos que se ha alterado en uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante

puede tener cambios “conservadores”, en que un aminoácido que se sustituye tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, el remplazo de leucina por isoleucina. De manera alternativa, una variante puede tener cambios “no conservadores”, por ejemplo, el remplazo de una glicina por un triptófano. Variaciones menores análogas pueden incluir también eliminaciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Las directrices de la determinación de los restos de aminoácidos que se pueden sustituir, insertar o eliminar sin eliminar la actividad biológica o inmunológica se puede encontrar utilizando programas de computadora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

Se pueden producir variantes naturales debido a la deriva antigénica. La deriva antigénica son pequeños cambios en las proteínas víricas que ocurren continuamente a lo largo del tiempo. Por lo tanto, una persona infectada con una cepa de virus de gripe particular desarrolla anticuerpos contra ese virus, si aparecen cepas nuevas de virus, los anticuerpos contra las cepas antiguas no reconocen más el virus más reciente y se puede producir una reinfección. Este es el porqué de una nueva vacuna para la gripe en cada estación. Además, algunos cambios en un virus de gripe puede producir que el virus de gripe cruce entre especies. Por ejemplo, algunos virus de gripe aviar desarrollaron variaciones genéticas asociadas con la capacidad de cruzar la barrera interespecies. Tal virus es capaz de producir una pandemia porque la población no tiene inmunidad natural contra el virus y el virus puede diseminarse fácilmente de persona a persona. Estas variaciones que se producen naturalmente de las proteínas de gripe se contemplan para su uso en la invención.

Los textos generales que describen las técnicas de biología molecular, que se aplican en la presente invención, tal como clonación, mutación, cultivo celular y similares, incluyen Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 ("Sambrook") and Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., ("Ausubel"). Estos textos describen la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros asuntos relevantes relacionados con estos, por ejemplo, la clonación y mutación de moléculas de HA y/o NA, etc. Por lo tanto, la invención también engloba la utilización de métodos conocidos de modificación proteína y tecnología de ADN recombinante para mejorar o alterar las características de las proteínas de gripe expresadas sobre o en las VLP de la invención. Se pueden utilizar varios tipos de mutagénesis para producir y/o aislar la variante de las moléculas de HA, NA y/o M1 y/o para modificar/mutar además los polipéptidos de la invención. Estas incluyen, pero no se limitan a estas, la dirigida al sitio, la mutagénesis de punto aleatorio, recombinación homóloga (mezclado de ADN), mutagénesis utilizando matrices que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada con fosforotioato, mutagénesis utilizando ADN doble con huecos o similares. Métodos adicionales adecuados incluyen reparación de punto de falta de coincidencia, mutagénesis utilizando cepas huésped deficientes de reparación, restricción-selección y restricción-purificación, mutagénesis de eliminación, mutagénesis por síntesis genética total, reparación de doble cadena rota, y similares. La mutagénesis, por ejemplo, la que implica construcciones quiméricas, está incluida también en la presente invención. En una realización, la mutagénesis se puede dirigir por la información que se conoce de la molécula de origen natural o bien alterada o la molécula mutada de origen natural, por ejemplo, secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina o similares.

La solicitud también describe variantes de proteínas de gripe que muestran actividad biológica sustancial, por ejemplo, que sea capaz de producir una respuesta de anticuerpos eficaz cuando se expresa sobre o en una VLP. Tales variantes incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones que se seleccionan de acuerdo con las reglas generales que se conocen en la técnica de forma que tengan poco efecto en la actividad.

Los métodos de clonación de dichas proteínas de gripe se conocen en la técnica. Por ejemplo, el gen de gripe que codifica una proteína de gripe específica ase puede aislar por RT-PCR a partir del ARNm poliadenilado extraído de las células que se han infectado con virus de gripe. El producto genético resultante se puede clonar como una inserción de ADN en un vector. El término “vector” se refiere al medio por el que se puede propagar y/o transferir un ácido nucleico entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, pro-virus, fagémidos, transposones, cromosomas artificiales, y similares, que se replican autónomamente o se pueden integrar en un cromosoma de una célula huésped. Un vector puede también ser un polinucleótido ARN desnudo, un polinucleótido ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto e ADN como ARN en la misma cadena, una ADN o ARN conjugado con poli-lisina, un ADN o ARN conjugado con un péptido, un ADN conjugado con liposomas, o similares, que no se replican autónomamente. En muchas, pero no todas de las realizaciones comunes, los vectores útiles en la presente invención son plásmidos o bácmidos.

Por lo tanto, la solicitud describe nucleótidos que codifican proteínas de gripe HA, NA y M1 que se clonan en un vector de expresión que se pueden expresar en una célula que induce la formación de VLP. Un “vector de expresión” es un vector, tal como un plásmido que es capaz de promocionar la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Normalmente, el ácido nucleico que se va a expresar está “unido operativamente” a un promotor y/o amplificador, y está sometido a un control regulador de la transcripción por el promotor y/o amplificador.

Opcionalmente, dichos nucleótidos que codifican HA de virus de gripe aviar, pandémico y/o estacional se selecciona de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Opcionalmente dichos nucleótidos que codifican NA de un virus de gripe aviar, pandémico y/o estacional, se selecciona de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9.

Dicho vector puede comprender nucleótidos que codifican proteína de gripe HA, NA y/o M1. De manera alternativa, dicho vector puede consistir en nucleótidos que codifican proteína HA, NA y M1. Un vector de expresión preferido es un vector baculovirus. Después de que se clonen los nucleótidos que codifican dichas proteínas de gripe, dichos nucleótidos se pueden modificar más. Por ejemplo, un experto en la técnica puede mutar bases específicas en la región codificante para producir variantes. Las variantes pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, no codificantes o ambas. Tales variantes pueden aumentar la inmunogenicidad de una proteína de gripe o eliminar el sitio de corte y empalme de una proteína o ARN. Por ejemplo, en una realización los sitios de corte y empalme donante y receptor de la proteína M de gripe (de longitud completa) se mutan para evitar el corte y empalme del ARNm M en transcripciones M1 y M2. En otra realización, se modifica HA para eliminar o mutar el sitio de escisión. Por ejemplo, la HA H5 de tipo silvestre tiene un sitio de escisión que contiene múltiples aminoácidos básicos (RRRKR). Esta secuencia de tipo silvestre hace a la HA más susceptible a múltiples proteasas ubicuas que pueden estar presentes en el huésped o el sistema de expresión de estas HA. En una realización, la eliminación de estos aminoácidos puede reducir la susceptibilidad de la HA a varias proteasas. En otra realización, el sitio de escisión se puede mutar para eliminar el sitio de escisión (por ejemplo, mutar a RESR).

La solicitud describe también ácidos nucleicos y polipéptidos que codifican NA, HA y M1. Un ácido nucleico o proteína NA de gripe ejemplar es idéntica en al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las SEC ID N^{os} 11, 31, 32, 39, 38, 46, 47, 54 o 55.

Un ácido nucleico o proteína HA ejemplar es idéntica en al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las SEC ID N^{os} 2, 10, 56, 57, 58, 27, 28, 29, 30, 37, 36, 33, 34, 35, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52, o 53. La proteína M1 de gripe que se utiliza en la presente invención es idéntica en al menos un 98 % o 99 % a la SEC ID N^o 49.

En algunas realizaciones, las mutaciones que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o eliminaciones silentes, que no alteran las propiedades o actividades de la proteína codificada o como se fabrican las proteínas. Las variantes de nucleótidos se pueden producir por varias razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un huésped particular (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por las células de insecto tales como las células Sf9). Véase la publicación de patente de EE. UU. 2005/0118191. Se desvelan ejemplos de secuencias de codón optimizado posteriormente (por ejemplo, las SEC ID 42, 44, 46, 48, 50, 52, y 54).

Además, los nucleótidos se pueden secuenciar para asegurarse de que se clonaron las regiones codificantes correctas y no contengan cualquier mutación no deseada. Los nucleótidos se pueden subclonar en un vector de expresión (por ejemplo, un baculovirus) para la expresión en cualquier célula. Lo anterior es solo un ejemplo de cómo se pueden clonar proteínas del virus de gripe. Un experto en la técnica entiende que hay disponibles y son posibles métodos adicionales.

La solicitud describe también construcciones y/o vectores que comprenden nucleótidos aviares, pandémicos y/o estacionales que codifican genes estructurales del virus de gripe, que incluyen NA, M1 y/o HA. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector vírico, o retrovírico. Las construcciones y/o vectores que codifican genes estructurales del virus de gripe aviar, pandémico y/o estacional, que incluyen NA, M1 y/o HA deberían estar unidos operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor polihedrina AcMNPV (u otro baculovirus), promotor PL de fago lambda, el lac, poa y tac de E. coli, los promotores tempranos y tardíos de SV40, y promotores de LTR retrovíricos, como ejemplos no limitantes. Otros promotores adecuados los conocerán los expertos en la técnica dependiendo de la célula huésped y/o la tasa de expresión deseada. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio y terminación de la transcripción, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de las transcripciones que se expresan por las construcciones preferentemente incluirán un codón de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación posicionado apropiadamente el final del péptido que se va a traducir.

Los vectores de expresión preferentemente incluirán al menos un marcador genético. Tales marcadores incluyen la dihidrofolato reductasa, resistencia a G418 o neomicina para cultivos celulares de eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo de E. coli y otras bacterias. Entre los vectores preferidos están los vectores víricos, tales como baculovirus, poxvirus (por ejemplo, virus vacunal, virus de viruela aviar, virus de viruela del canario, virus de viruela aviar, virus de viruela del mapache, virus de viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), herpesvirus, y retrovirus. Otros vectores que se pueden utilizar comprenden vectores para su uso en bacterias que comprenden pQE70, pQE60 y pQE-9, pBluescript, vectores Fagoscript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5. Entre los vectores para eucariotas preferidos están pFastBac1 pWINEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVL. Otros vectores adecuados serán fácilmente aparentes para el experto en la técnica. Opcionalmente, dicho vector que comprende nucleótidos que codifican genes estructurales del virus de gripe aviar, pandémico o estacional,

incluyendo HA, M1 y/o NA, es pFastBac. De manera alternativa, dicho vector que comprende una inserción que consiste en nucleótidos que codifican genes estructurales de virus de gripe aviar, pandémica o estacional, comprende HA, M1 y NA, pFastBac

- 5 A continuación, el vector recombinante puede transfectarse, infectarse, o transformarse en una célula huésped adecuada. Por lo tanto, la solicitud proporciona células huésped que comprenden un vector (o vectores) que contienen ácidos nucleicos que codifican HA, M1 y/o NA y permiten la expresión de HA, M1 y/o NA en dicha célula huésped bajo condiciones que permitan la formación de VLP.
- 10 Las construcciones recombinantes mencionadas anteriormente se podrían utilizar para transfectar, infectar, o transformar y puedan expresar proteínas de gripe HA, NA y M1 en células eucariotas y/o células procariotas. Entre las células huésped eucariotas están las células huésped de levadura, insecto, aviares, vegetales, *C. elegans* (o nematodo) y de mamífero. Ejemplos no limitantes de células de insecto son, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo Sf9, Sf21, células de *Trichoplusia ni*, por ejemplo células High Five y células de *Drosophila* S2. Ejemplos de células huésped de hongos (que incluyen levaduras) son *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), especies de *Candida* incluyendo *C. albicans* y *C. glabrata*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris*, y *Yarrowia lipolytica*. Ejemplos de células de mamífero son células COS, células de riñón de cría de hámster, células L de ratón, células LNCaP, células de ovario de hámster chino (CHO), células embrionarias de riñón humanas (HEK), y células de mono africano verde, células CV1, células HeLa, células MDCK, células Vero y
- 20 Hep-2. También se pueden utilizar oocitos de *Xenopus laevis*, u otras células de origen anfibio. Las células huésped procariotas incluyen células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, y micobacterias.

- Los vectores, por ejemplo, los vectores que comprenden polinucleótidos HA, NA y M1, se pueden transfectar en las células huésped de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la introducción ácidos nucleicos en células eucariotas se puede realizar por co-precipitación en fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, y transfección empleando reactivos de transfección poliamina. En una realización, dicho vector es un baculovirus recombinante.
- 25

- De acuerdo con la presente invención, la VLP se expresa a partir de una célula de insecto. En otra realización, dicha célula de insecto es una célula Sf9.
- 30

- También se describe en el presente documento un vector y/o una células huésped que comprenden nucleótidos que codifican una proteína HA del virus de la gripe aviar, pandémica y/o estacional que se selecciona de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. También se describe un vector y células huésped que comprenden nucleótidos que codifican una proteínas NA que se selecciona de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9. Dicho vector y/o célula huésped puede comprender HA, M1 y/o NA de gripe. Dicho vector y/o células huésped puede consistir en proteína de gripe que comprende HA, M1 y NA. Estos vectores y/o células huésped contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA). Dichos nucleótidos pueden codificar una HA y/o la NA que muestran actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente, cuando se expresan en la superficie de las VLP.
- 35
- 40

- Esta solicitud también describe construcciones y métodos que aumentarán la eficacia de la producción de VLP. Por ejemplo, eliminando sitios de escisión de las proteínas con el fin de aumentar la expresión proteica (véase anteriormente). Otro método comprende la adición de secuencias directoras para la proteína HA, NA y/o M1 para un transporte más eficaz. Por ejemplo, se puede fusionar una secuencia de señal heteróloga a la proteína de gripe HA, NA y/o M1. En una realización la secuencia de señal se puede derivar del gen de una célula de insecto y fusionarse a la proteína HA de gripe (para la expresión en células de insecto). En otra realización, el péptido de señal es la secuencia de señal de Quitinasa, que funciona eficazmente en los sistemas de expresión de baculovirus. En otra realización, el intercambio de secuencias directoras entre las proteínas de gripe puede proporcionar un mejor transporte proteico. Por ejemplo, se ha demostrado que la hemaglutinina H5 es menos eficaz a la hora de transportarse a la superficie de partículas. Las hemaglutininas H9, sin embargo, se dirige a la superficie y se integra en la superficie más eficazmente. Por lo tanto, en una realización, se fusiona la secuencia directora H9 a la proteína H5.
- 45
- 50
- 55

- Otro método para aumentar la eficacia de la producción de VLP es en el codón optimizar los nucleótidos que codifican proteínas HA, NA y/o M1 para un tipo celular específico. Por ejemplo, el codón que optimiza ácidos nucleicos para la expresión en células Sf9 (véase la publicación de patente de EE. UU. 2005/0118191). Se desvelan posteriormente ejemplos de secuencias de codón optimizado para células Sf9 (por ejemplo, las SEC ID N^{os} 42, 44, 46, 48, 50, 52, y 54). La secuencia de ácido nucleico del codón optimizado de proteína de gripe puede ser al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96, 97, 98, o 99 % de cualquiera de las SEC ID N^{os} 42, 44, 46, 48, 50, 52, y 54.
- 60

- La solicitud también describe métodos de producción de VLP, comprendiendo dichos métodos la expresión de proteínas de gripe aviares, pandémicas y/o estacionales bajo condiciones que permiten la formación de VLP. Dependiendo del sistema de expresión y célula huésped seleccionada, las VLP se producen cultivando las células
- 65

huésped transformadas por un vector de expresión bajo condiciones por las que se expresan proteínas recombinantes y se forman las VLP. La selección de las condiciones de cultivo adecuadas están en la técnica o un experto con la técnica de alguien experto habitual en la técnica.

5 Los métodos para cultivar células modificadas para producir VLP de la invención incluyen, pero no se limitan a técnicas de cultivo celular discontinuo, semicontinuo, continuo y de perfusión. Cultivo celular significa el cultivo y propagación de células en un biorreactor (una cámara de fermentación) donde se propagan las células y expresan la proteína (por ejemplo, proteínas recombinantes) para la purificación y aislamiento. Normalmente, el cultivo celular se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad, temperatura y atmosféricas controladas en un biorreactor. Un
10 biorreactor es una cámara que se utiliza para cultivar células en el que las condiciones ambientales tales como la temperatura, atmósfera, agitado y/o pH se pueden controlar. En una realización, dicho biorreactor es una cámara de acero inoxidable. En otra realización, dicho biorreactor es una bolsa de plástico pre-esterilizada (por ejemplo Celbag®, Wave Biotech, Bridgewater, NJ). En otra realización, dichas bolsas de plástico pre-esterilizadas son bolsas de aproximadamente 50 l a 100 l.

15 Las VLP se aíslan entonces utilizando métodos que conserven la integridad de las mismas, tal como por centrifugación en gradiente, por ejemplo, de cloruro de cesio, sacarosa, y yodixanol, así como técnicas de purificación de referencia que incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel.

20 Lo siguiente es un ejemplo de cómo las VLP de la invención se pueden fabricar, aislar y purificar. Habitualmente las VLP se producen a partir de líneas celulares recombinantes modificadas para crear VLP cuando dichas células se cultivan en un cultivo celular (véase anteriormente). La producción de VLP se puede conseguir por el esquema que se ilustra en la Figura 26. Un experto en la técnica entendería que hay métodos adicionales que se pueden utilizar para fabricar y purificar las VLP de la invención, por lo tanto, la invención no se limita al método descrito.

25 La producción de VLP de la invención puede iniciarse sembrando células Sf9 (no infectadas) en matraces con agitado, permitiendo a las células expandirse y aumentando según crecen y se multiplican (por ejemplo, de un matraz de 125 ml a una bolsa Wave de 50 l). El medio que se usa para cultivar las células se formula para la línea celular apropiada (preferentemente medio libre de suero, por ejemplo el medio para insecto ExCell-420, JRH).
30 Después, dichas células se infectan con baculovirus recombinante a la multiplicidad más eficaz de infección (por ejemplo, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades formadoras de placas por célula). Una vez que se produce la infección, las proteínas de gripe HA, NA y M1 se expresan a partir del genoma vírico, se auto-ensamblan en VLP y se segregan de las células aproximadamente a las 24 a 72 horas tras la infección. Habitualmente, la infección es más eficaz cuando las células están en fase medio logarítmica de crecimiento ($4-8 \times 10^6$ células/ml) y son al menos viables en un 90 %.

35 Las VLP de la invención se pueden recolectar aproximadamente a las 48 a 96 horas tras la infección, cuando los niveles de VLP en el medio de cultivo están cerca del máximo, pero antes de la lisis celular extensa. La densidad y viabilidad celular Sf9 en el momento de la recolección puede ser aproximadamente de $0,5 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con al menos una viabilidad del 20 %, como se muestra por el ensayo de exclusión por tinción. Después, el medio se retira y se clarifica. Se puede añadir NaCl al medio a una concentración de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,0 M, preferentemente a aproximadamente 0,5 M, para evitar la agregación de VLP. La retirada de las células y restos celulares del medio de cultivo celular que contiene las VLP de la invención se puede conseguir por filtración de flujo tangencial (TFF) con un cartucho de filtro pre-esterilizado
45 desechable de fibras huecas de 0,5 a 1,00 μm o un dispositivo similar.

Después, las VLP en el medio de cultivo clarificado se puede concentrar por ultracentrifugación utilizando un cartucho de fibra hueca pre-esterilizado, desechable, con el corte a un peso molecular de 500.000. Las VLP concentradas se pueden diafiltrar contra 10 volúmenes de solución salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0 a 8,0 que contiene 0,5 M de NaCl para eliminar los componentes residuales del medio.
50

Las VLP concentradas, diafiltradas se pueden purificar más en un gradiente discontinuo de sacarosa del 20 % al 60 % en tampón PBS a pH 7,2 con un 0,5 M de NaCl por centrifugación a $6.500 \times g$ durante 18 horas a aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C . Habitualmente, las VLP formarán una banda distintiva visible
55 entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 40 % de sacarosa o en la interfase (en un gradiente en etapas del 20 % y 60 %) que se puede recolectar del gradiente y se puede almacenar. Este producto se puede diluir para que comprenda 200 mM de NaCl en la preparación para la nueva etapa del proceso de purificación. Este producto contiene VLP y puede contener partículas de baculovirus intactas.

60 Se puede conseguir purificar más las VLP por cromatografía de intercambio aniónico, o centrifugación en colchón de sacarosa isopícnica al 44 %. En la cromatografía de intercambio aniónico, la muestra del gradiente de sacarosa (véase anteriormente) se carga en la columna que contiene un medio con un anión (por ejemplo, Matrix Fractogel EMD TMAE) y se eluye por medio de un gradiente de sal (desde aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 1,0 M de NaCl) que puede separar las VLP de otros contaminantes (por ejemplo, baculovirus y ADN/ARN). En el método del cojín de sacarosa, la muestra que comprende las VLP se añade a un colchón de sacarosa al 44 % y se centrifuga durante aproximadamente 18 horas a 30.000 g. Las VLP forman una banda en la parte superior de la
65

sacarosa al 44 %, mientras que el baculovirus precipita en el fondo y otras proteínas contaminantes permanecen en la capa del 0 % de sacarosa en la superficie. El pico de VLP o la banda, se recolecta.

El baculovirus intacto se puede inactivar, si se desea. La inactivación se puede conseguir por métodos químicos, por ejemplo, formalina o β -propil lactona (BPL). La eliminación o inactivación del baculovirus intacto también se puede conseguir en gran medida utilizando precipitación selectiva y métodos cromatográficos que se conocen en la técnica, como se ha ejemplificado anteriormente. Los métodos de inactivación comprenden la incubación de la muestra que contiene VLP en un 0,2 % de BPL durante 3 horas a aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C. El baculovirus también se puede inactivar incubando la muestra que contiene las VLP a 0,05 % a 4 °C durante 3 días, y luego a 37 °C durante una hora.

Tras la etapa de inactivación/eliminación, el producto que comprende las VLP se puede someter a otra etapa de diafiltración para eliminar cualquier reactivo de la etapa de inactivación y/o cualquier sacarosa residual, y para colocar las VLP en el tampón deseado (por ejemplo, PBS). La solución que comprende las VLP se puede esterilizar por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, filtración estéril) y almacenarse en el refrigerador o congelador.

Las técnicas anteriores se pueden practicar a lo largo de varias escalas. Por ejemplo, matraces-T, matraces con agitado, matraz de agitación, hasta biorreactores de tamaño industrial. Los biorreactores pueden comprender o depósitos de acero inoxidable o una bolsa de plástico pre-esterilizada (por ejemplo, el sistema que vende Wave Biotech, Bridgewater, NJ). Un experto en la técnica sabrá la que es más deseable para estos fines.

La expansión y producción de vectores de expresión de baculovirus y la infección de las células con baculovirus recombinantes para producir VLP recombinantes de gripe se puede conseguir en células de insecto, por ejemplo, en células de insecto Sf9 como se ha descrito previamente. En una realización preferida, las células que se infectan con baculovirus modificado para producir VLP de gripe son SF9.

Formulaciones farmacéuticas o vacunas y su administración

Las composiciones farmacéuticas útiles en el presente documento contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, que incluye cualquier agente farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de una respuesta inmunitaria perjudicial para el vertebrado que recibe la composición, y que se puede administrar sin toxicidad innecesaria y una VLP de la invención. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno estatal o federal o que se enumere en la Farmacopea de EE. UU., Farmacopea Europea u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en vertebrados, y más particularmente en seres humanos. Estas composiciones pueden ser útiles como una vacuna y/o como composiciones antigénicas para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado.

Dichas formulaciones farmacéuticas de la invención comprenden VLP que comprenden una proteína M1, HA y/o NA y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril, y combinaciones de los mismos. Una exposición más profunda de los vehículos, diluyentes, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables se presenta en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. última edición). La formulación debería adecuarse al modo de administración. En una realización preferida, la formulación es adecuada para su administración a seres humanos, preferentemente es estéril, no particulada, y/o no pirogénica.

La composición, si se desea, también puede contener cantidades menos importantes de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición puede estar en forma sólida, tal como un polvo liofilizado adecuado para su reconstitución, una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos de referencia tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos con uno o más de los ingredientes de las formulaciones vacunales de la invención. En una realización preferida, el kit comprende dos envases, uno que contiene las VLP y el otro que contiene un adyuvante. Junto con tales envases puede haber un prospecto en la forma que prescriba la agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo prospecto refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o vena para la administración humana.

La invención también proporciona que la formulación VLP se envasa en un envase sellado herméticamente tal como una ampolla o papellillo que indica la cantidad de composición. En una realización, la composición VLP se suministra como un líquido, en otra realización, como un polvo seco liofilizado estéril o concentrado libre de agua en un envase sellado herméticamente y se puede reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración adecuada para la administración a un sujeto. Preferentemente, la composición de VLP se suministra como un polvo liofilizado estéril en un envase sellado herméticamente como una unidad de dosificación de preferentemente,

aproximadamente 1 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 125 µg, aproximadamente 150 µg, o aproximadamente 200 µg. De manera alternativa, la unidad de dosificación de la composición de VLP es menor de aproximadamente 1 µg, (por ejemplo, aproximadamente 0,08 µg, aproximadamente 0,04 µg; aproximadamente 0,2 µg, aproximadamente 0,4 µg, aproximadamente 0,8 µg, aproximadamente 0,5 µg o menos, aproximadamente 0,25 µg o menos, o aproximadamente 0,1 µg o menos), o más de aproximadamente 125 µg, (por ejemplo, aproximadamente 150 µg o más, aproximadamente 250 µg o más, o aproximadamente 500 µg o más). Estas dosis se pueden medir como VLP totales o como µg de HA. La composición de VLP debería administrarse en aproximadamente 12 horas, preferentemente en aproximadamente 6 horas, en aproximadamente 5 horas, en aproximadamente 3 horas, o en aproximadamente 1 hora después de reconstituirse a partir del polvo liofilizado.

En una realización alternativa, una composición VLP se suministra en forma líquida en un envase sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración de la composición DE VPL. Preferentemente, la forma líquida de la composición VLP se suministra en un envase sellado herméticamente al menos aproximadamente a 50 µg/ml, más preferentemente al menos a aproximadamente 100 µg/ml, al menos a aproximadamente 200 µg/ml, o al menos 1 mg/ml.

En general, las VLP de gripe de la invención se administran en una cantidad eficaz o cantidad (como se define anteriormente) suficiente para estimular una respuesta inmunitaria contra una o más cepas del virus de la gripe. Preferentemente la administración de la VLP de la invención produce una inmunidad sustancial contra al menos un virus de gripe. Normalmente, la dosis se ajustará en este intervalo basándose en, por ejemplo, la edad, estado físico, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, y otros factores clínicos. La formulación vacunal profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, por inyección subcutánea o intramuscular utilizando una jeringa y una aguja, o un dispositivo de inyección sin aguja. De manera alternativa, la formulación vacunal se administra por vía intranasal, sea en gotas, aerosol de grandes partículas (mayores de aproximadamente 10 micras), o pulverizador en el tracto respiratorio superior. Aun que cualquiera de las vías de suministro anteriores da como resultado una respuesta inmunitaria, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad mucosa en el sitio de entrada del virus de la gripe.

Por lo tanto, la solicitud también describe un método de formulación de una vacuna o composición antigénica que induce una inmunidad sustancial contra la infección del virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma a un sujeto, que comprende la adición de dicha formulación una dosis eficaz de una VLP de gripe.

Aunque se prefiere la estimulación de una inmunidad sustancial con una única dosis, se pueden administrar dosis adicionales, por la misma vía o diferente, para conseguir el efecto deseado. En neonatos y niños, por ejemplo, se pueden necesitar múltiples administraciones para provocar suficientes niveles de inmunidad. La administración puede continuar a intervalos durante la infancia, según se necesite para mantener niveles de protección suficientes contra la infección de gripe. De manera similar, los adultos que son particularmente susceptibles de repetir o de infección de gripe grave, tal como, por ejemplo, trabajadores de salud pública, trabajadores de salud primaria, miembros de la familia de niños pequeños, los ancianos, y los individuos con una función cardiopulmonar comprometida pueden necesitar múltiples inmunizaciones para establecer y/o mantener respuestas inmunitarias protectoras. Los niveles de inmunidad que se inducen se pueden controlar, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos neutralizantes secretores y del suero, y se ajustan las dosificaciones o se repiten las vacunaciones según se necesite para provocar o mantener los niveles de protección que se deseen.

Por lo tanto, en una realización, un método para inducir inmunidad sustancial contra la infección del virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP comprende proteínas HA, NA y M1. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consiste esencialmente en HA, NA y M1 de gripe. Dichas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración al menos de una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consisten en HA, NA y M1 de gripe. En otra realización, dichas HA, NA y M1 de gripe se derivan del virus de la gripe estacional y/o la gripe aviar. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe que comprende proteínas de gripe en que dichas proteínas de gripe consisten en proteínas HA, NA y M1. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA). En otra realización, dicha HA y/o NA muestran actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dicho sujeto es un mamífero. En otra realización dicho mamífero es un ser humano. En otra realización, el método comprende la inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma

administrando dicha formulación en una dosis. En otra realización, el método comprende la inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma administrando dicha formulación en dosis múltiples.

- 5 Los métodos de administración de una composición que comprende VLP (vacuna y/o formulaciones antigénicas) incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intravenosa o subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vía intranasal y oral o pulmonar o por supositorios). En una realización específica, las composiciones de la presente invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, transdérmica, o intradérmica. Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo
10 por infusión o infección en embolada, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, de colon, conjuntiva, nasofaringe, orofaringe, vagina, uretra, vejiga urinaria y mucosa intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. En algunas realizaciones, la vía intranasal u otras vías mucosas de administración de la composición que comprende VLP de la invención puede inducir un anticuerpo u otra respuesta inmunitaria que es sustancialmente más alta que otras vías de administración.
15 En otra realización, la vía intranasal u otras vías mucosas de administración de una composición que comprenden VLP de la invención puede inducir un anticuerpo u otra respuesta inmunitaria que inducirá una protección cruzada contra otras cepas de virus de gripe. La administración puede ser sistémica o local.

20 En otra realización más, la vacuna y/o formulación antigénica se administra de tal manera que se dirige a los tejidos mucosos con el fin de provocar una respuesta inmunitaria en el sitio de la inmunización. Por ejemplo, se puede dirigir a los tejidos mucosos tales como el tejido linfóide asociado al intestino (GALT) para inmunizarlo utilizando la administración oral de composiciones que contienen adyuvantes con propiedades que se dirigen a una mucosa en particular. También se pueden dirigir a tejidos mucosos adicionales, tales como el tejido linfóide nasofaríngeo (NALT) y el tejido linfóide asociado a bronquios (BALT).

25 Las vacunas y/o formulaciones antigénicas de la invención también se pueden administrar con una dosificación programada, por ejemplo, una administración inicial de la composición vacunal con posteriores administraciones de refuerzo. En realizaciones particulares, se administra una segunda dosis de la composición en cualquier momento de entre dos semanas y un año, preferentemente desde aproximadamente 1, aproximadamente 2,
30 aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 a aproximadamente 6 meses, tras la administración inicial. Adicionalmente, se puede administrar una tercera dosis tras la segunda dosis y desde aproximadamente 3 meses a aproximadamente dos años, o incluso más, preferentemente aproximadamente 4, aproximadamente 5, or aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 7 meses a aproximadamente un año tras la administración inicial. La tercera dosis se puede administrar opcionalmente cuando no se detectan o están bajos los niveles de
35 inmunoglobulinas específicas en el suero y/u orina o secreciones mucosas del sujeto tras la segunda dosis. En una realización preferida, se administra una segunda dosis aproximadamente un mes después de la primera administración y se administra una tercera dosis aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otra realización, la segunda dosis se administra aproximadamente seis meses después de la primera administración.

40 En otra realización, dicha VLP de la invención se puede administrar como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, las VLP de la invención se pueden formular con otras composiciones inmunogénicas y/o antivíricos (por ejemplo, Amantadina, Rimantadina, Zanamivir Y Osteltamivir).

45 La dosificación de la formulación farmacéutica puede determinarla fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, identificando primero las dosis eficaces para provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica, por ejemplo, midiendo el título en el suero de las inmunoglobulinas específicas del virus o midiendo la relación inhibidora de anticuerpo en las muestras de suero, o muestras de orina, o secreciones mucosas. Dichas dosificaciones se pueden determinar a partir de los estudios con animales. Una lista no limitante de animales que se utilizan para estudiar el virus de gripe incluyen cobayas, hámster sirio, chichilla, erizo, pollo, rata, ratón y hurón. La mayoría de los animales no son huéspedes naturales del virus de gripe pero siguen sirviendo para los estudios de
50 varios aspectos de la enfermedad. Por ejemplo, cualquiera de los animales anteriores, se puede dosificar con un candidato a vacuna, por ejemplo, con VLP de la invención, para caracterizar parcialmente la respuesta inmunitaria que se induce, y/o determinar si se ha producido algún anticuerpo neutralizante. Por ejemplo, se han llevado a cabo muchos estudios en modelo de ratón que debido a su pequeño tamaño y su bajo coste permite a los investigadores llevar a cabo estudios a gran escala. Sin embargo, el tamaño pequeño del ratón también aumenta la dificultad para observar fácilmente cualquier signo clínico de la enfermedad y el ratón no es un modelo predictivo para la enfermedad en los seres humanos.

60 Se ha hecho extensivo el uso de hurones para estudiar varios aspectos de la infección por virus de gripe y su curso de acción. El desarrollo de muchos conceptos contemporáneos de inmunidad contra el virus de gripe sería imposible sin el uso del hurón. (Maher, *et al.* 2004). Los hurones han demostrado ser un buen modelo para estudiar la gripe por varias razones: la infección de gripe en el hurón se parece estrechamente a la de los seres humanos con respecto a los signos clínicos, patogénesis, e inmunidad; Los tipos A y B del virus de la gripe humana infectan al hurón, proporcionando así una oportunidad para estudiar una población completamente controlada en la observar la interacción de la transmisión de la infección, la enfermedad, y la variación de secuencia de los aminoácidos en las
65

glucoproteínas del virus de gripe; y los hurones tienen otras características físicas que lo hacen un modelo ideal para descifrar las manifestaciones de la enfermedad. Por ejemplo, los hurones y los seres humanos muestran signos clínicos muy similares de infección de gripe que parecen depender de la edad del huésped, la cepa del virus, las condiciones ambientales, el grado de infección bacteriana secundaria, y muchas otras variables. Por lo tanto un experto en la técnica puede correlacionar más fácilmente la eficacia de una vacuna de gripe y los regímenes de dosificación a partir del modelo de hurón a seres humanos en comparación con el de ratón o cualquier otro modelo descrito anteriormente.

Además, se pueden llevar a cabo estudios clínicos en humanos para que un experto determine la dosis eficaz preferida para humanos. Tales estudios clínicos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. La dosis precisa que se va emplear dependerá también de la vía de administración. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de los sistemas de ensayo *in vitro* y con animales.

Como también se conoce bien en la técnica, la inmunogenicidad de una composición en particular se puede aumentar con el uso de estimulantes no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes se han utilizado experimentalmente para promover un aumento generalizado de la inmunidad contra antígenos desconocidos (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N° 4.877.611). Los protocolos de inmunización se han utilizado durante muchos años para estimular las respuestas, y como tales, los adyuvantes se conocen bien por los expertos en la técnica. Algunos adyuvantes afectan la manera en la que se presentan los antígenos. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria se aumenta cuando los antígenos proteicos se precipitan con alúmina. La emulsificación de antígenos también prolongan la duración de la presentación del antígeno. La inclusión de cualquier adyuvante descrita en Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2ª Edición)," se incluye en el ámbito de la presente invención.

Ejemplarmente, los adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund (un estimulante no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muertos), adyuvante incompleto de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio. Otros adyuvantes incluyen GMCSF, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos MDP, tales como tur-MDP y nor-MDP, CGP (MPT-PE), lípido A, y lípido A monofosforilo (MPL). También se contemplan el RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión del 2 % de escualeno/Tween 80. También se pueden utilizar MF-59, Novasomes®, antígenos MHC.

En una realización de la invención el adyuvante es una vesícula de lípido paucilamellar que tiene aproximadamente de dos a diez bicapas dispuestas de forma de conchas sustancialmente esféricas separadas por capas acuosas rodeadas de una gran cavidad central amorfa libre de bicapas lipídicas. Las vesículas lipídicas paucilamelares pueden actuar para estimular la respuesta inmunitaria de varias maneras, como estimulantes no específicos, como vehículos para el antígeno, como vehículos para adyuvantes adicionales, y combinaciones de las mismas. Las vesículas lipídicas paucilamelares actúan como estimuladores no específicos cuando, por ejemplo, se prepara una vacuna entremezclando el antígeno con las vesículas pre-formadas tal que el antígeno permanece extracelular a las vesículas. Encapsulando un antígeno en la cavidad central de la vesícula, la vesícula actúa tanto como estimulante inmunitario y como vehículo para el antígeno. En otra realización, las vesículas se fabrican primariamente de vesículas no fosfolípidos. En otra realización las vesículas son Novasomes. Las Novasomes® son vesículas paucilamelares no fosfolipídicas que varían desde aproximadamente 100 nm a aproximadamente 500 nm. Comprenden Brij 72, colesterol, ácido oleico y escualeno. Las Novasomes han demostrado que son adyuvantes eficaces para los antígenos de gripe (véase las Patentes de EE. UU. 5.629.021, 6.387.373, and 4.911.928).

En un aspecto el efecto adyuvante se consigue por el uso de un agente, tal como la alúmina, que se utiliza en una solución aproximadamente del 0,05 a aproximadamente el 0,1 % en solución salina fosfato tamponada. De manera alternativa, las VLP se pueden hacer como una mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol®) que se utiliza como una solución de aproximadamente el 0,25 %. Algunos adyuvantes, por ejemplo, ciertas moléculas orgánicas que se obtienen a partir de bacterias; actúan sobre el huésped más que sobre el antígeno. Un ejemplo es el dipéptido muramilo (N-acetilmurilmil-L-alanil-D-isoglutamina [MDP]), un peptidoglucano bacteriano. En otras realizaciones, se pueden utilizar también hemocianinas y hemoeritrinas con las VLP de la invención. El uso de hemocianina de la lapa californiana (KLH) se prefiere en ciertas realizaciones, aunque se pueden emplear hemocianinas y hemoeritrinas de otros moluscos y artrópodos.

También se pueden utilizar varios adyuvantes polisacáridos. Por ejemplo, se ha descrito el uso de varios adyuvantes polisacáridos de neumococos sobre las respuestas de anticuerpo de ratones (Yin *et al.*, 1989). Las dosis que producen respuestas óptimas, o de otra manera que no producen supresión, se deberían emplear como se indica (Yin *et al.*, 1989). Se prefieren particularmente las variedades poliamina de polisacáridos, tales como la quitina y el quitosano, incluyendo la quitina desacetilada. En otra realización, se utiliza un derivado tripéptido-disacárido del dipéptido muramilo que se ha descrito para su uso en liposomas artificiales formados de fosfatidil colina y fosfatidil glicerol.

Los agentes anfipáticos y tensioactivos, por ejemplo, la saponina y derivados tales como QS21 (Cambridge Biotech), forman otro grupo más de adyuvantes para su uso con las VLP de la invención. También se pueden

emplear tensioactivos copolímeros bloqueantes no iónicos (Rabinovich *et al.*, 1994). Los oligonucleótidos son otro grupo de adyuvantes útiles (Yamamoto *et al.*, 1988). Otros adyuvantes que se pueden utilizar en ciertas realizaciones de la presente invención son QuilA y lentineno.

- 5 Otro grupo de adyuvantes son las endotoxinas detoxificadas, tales como la endotoxina detoxificada refinada de la Pat de EE. UU. Nº 4.435.386. También se contemplan las combinaciones de endotoxinas detoxificadas con dimicolato de trehalosa y los glucolípidos endotóxicos (Pat. de EE. UU. Nº 4.505.899), como la combinación de endotoxinas con esqueleto de la pared celular (CWS) o CWS y dimicolato de trehalosa, como se describe en las Pat. de EE. UU. Nºs 4.436.727, 4.436.728 y 4.505.900. Las combinaciones de solo CWS y dimicolato de trehalosa, sin
10 endotoxinas detoxificadas, también se ha visto que son útiles, como describen en la Pat. de EE. UU. Nº 4.520.019.

Los expertos en la técnica sabrán los diferentes tipos de adyuvantes que se pueden conjugar con las vacunas de acuerdo con la presente invención y estas incluyen alquil lisofosfolípidos (ALP); BCG; y biotina (incluyendo los derivados biotinilados) entre otros. Ciertos adyuvantes particularmente contemplados para su uso son los ácidos
15 teicoicos de las células Gram -. Estos incluyen los ácidos lipoteicoicos (LTA), ácidos ribitol teicoicos (RTA) y ácido glicerol teicoico (GTA). Las formas activas de sus equivalentes sintéticos también se pueden emplear en conexión con la invención (Takada *et al.*, 1995).

Varios adyuvantes, incluso los que no se utilizan habitualmente en seres humanos, se pueden emplear en otros
20 vertebrados, en los que, por ejemplo, se desea producir anticuerpos o para obtener posteriormente células T activadas. La toxicidad u otros efectos secundarios que pueden resultar de los adyuvantes o de las células, por ejemplo, como se puede producir utilizando células tumorales no irradiadas, es irrelevante en tales circunstancias.

Otro método para inducir una respuesta inmunitaria se puede conseguir formulando las VLP de la invención con
25 "estimulantes inmunitarios". Estos son mensajeros químicos propios del cuerpo (citoquinas) para aumentar la respuesta del sistema inmunitario. Los estimulantes inmunitarios incluyen, pero no se limitan a estos, varias citoquinas, linfoquinas y quimioquinas con actividades inmunoestimulantes, inmunopotenciadoras, y pro-inflamatorias, tales como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM) (CSF)); y otras moléculas
30 inmunoestimulantes, tales como el factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimulantes se pueden administrar en la misma formulación que las VLP de gripe, o se pueden administrar por separado. Se puede administrar o la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína para producir un efecto inmunoestimulante.

35 **Método de estimulación de una respuesta inmunitaria anti-gripe**

Las VLP de la invención son útiles para preparar composiciones que estimulan la respuesta inmunitaria que confiere
inmunidad o inmunidad sustancial contra los virus de gripe. Tanto la inmunidad mucosa como celular pueden contribuir a la inmunidad contra la infección de gripe y la enfermedad. Los anticuerpos segregados localmente en el
40 tracto respiratorio superior son el factor más importante en la resistencia a la infección natural. La inmunoglobulina A segregada (sIgA) está implicada en la protección del tracto respiratorio superior y la IgG sérica en la protección del tracto respiratorio inferior. La respuesta inmunitaria inducida por una infección protege contra la re-infección con el mismo virus o una cepa vírica antígenicamente similar. El virus de gripe se somete a cambios frecuentes e impredecibles; por lo tanto, tras la infección natural, el periodo de protección que se proporciona por la inmunidad del
45 huésped puede ser de solo unos pocos años contra las nuevas cepas de virus que circulan en la comunidad.

Las VLP de la invención pueden inducir inmunidad sustancial en un vertebrado (por ejemplo, un ser humano) cuando se administran a dicho vertebrado. La inmunidad sustancial resulta de una respuesta inmunitaria contra la
50 VLP de gripe de la invención que protege o mejora la infección de gripe o al menos reduce un síntoma de la infección del virus de la gripe en dicho vertebrado. En algunos casos, si dicho vertebrado se infecta, dicha infección será asintomático. La respuesta puede ser una respuesta no completamente protectora. En este caso, si dicho vertebrado se infecta con in virus de gripe, el vertebrado experimentará síntomas reducidos o de duración más corta de los síntomas en comparación con un vertebrado no inmunizado.

55 En una realización, la invención comprende un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un su jeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe. En otra realización, dicha inducción de inmunidad sustancial reduce la duración de los síntomas de gripe. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un su jeto, comprende la administración de al
60 menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP comprende las proteínas HA, NA y M1 de gripe. En otra realización, dicha VLP de gripe comprende proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en las proteínas HA, NA y M1. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintos de fragmentos de M1, HA y/o NA). En otra realización, el método de
65 inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de tripe, en que dicha VLP

consiste esencialmente en HA, NA y M1 de gripe. Dichas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consiste en HA, NA y M1 de gripe. En otra realización, dicha HA y/o NA muestran actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dicho sujeto es un mamífero. En otra realización, dicho mamífero es un ser humano. En otra realización, dicha VLP se formula como un adyuvante o estimulante inmunitario.

Recientemente se ha coordinado un esfuerzo para crear una vacuna contra el virus de la gripe aviar que tiene el potencial de crear una pandemia. Esto es debido a varios virus de gripe aviar que han cruzado la barrera interespecies y han infectado seres humanos directamente dando lugar a enfermedad, y en algunos casos, la muerte. Estos virus eran H5N1, H9N2 y H7N7 (Cox *et al.*, 2004). Un reciente estudio examinaba el potencial de utilizar el virus de gripe H5N1 inactivado como una vacuna. La formulación de la vacuna era similar a las vacunas inactivadas con licencia que se aprueban actualmente para su comercialización. El estudio concluyó que el uso del virus H5N1 inactivado inducía una respuesta inmunitaria en seres humanos, sin embargo la dosis que se daba era muy alta (90 µg de gripe aviar en comparación con los 15 µg de la vacuna aprobada) (Treanor *et al.*, 2006). Esta alta cantidad de antígeno de gripe aviar es impracticable para una campaña de vacunación mundial. Como se ilustra posteriormente, las VLP de la invención inducen una respuesta inmunitaria en un vertebrado cuando se administra a dicho vertebrado.

Por lo tanto, la invención engloba una VLP para su uso en un método de inducción de una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP DE GRIPE AVIAR. En otra realización, dicha inducción de inmunidad sustancial reduce la duración de los síntomas de gripe. En otra realización, dicha inducción de inmunidad es por la administración de al menos 0,2 µg de HA aviar en las VLP de la invención. En otra realización, dicha inducción de la inmunidad es por la administración de aproximadamente 0,2 µg de HA aviar a aproximadamente 15 µg de HA aviar en las VLP de la invención. La administración puede ser en una o más dosis, pero puede ser ventajosamente en una única dosis. En otra realización, dicha VLP aviar se deriva del H5N1 de gripe aviar.

En otra realización, la invención comprende una VLP para su uso en un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe aviar o al menos un síntoma de la misma en un sujeto que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe aviar, en que dicha VLP comprende HA, NA y M1 de gripe aviar. En otra realización dicha VLP de gripe aviar comprende proteínas de gripe aviar, en que dichas proteínas de gripe aviar consisten en las proteínas HA, NA y M1. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA). En otra realización, dicho método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe aviar o al menos un síntoma de la misma en un sujeto comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe aviar, en que dicha VLP consiste esencialmente en HA, NA y M1 de gripe aviar. Dichas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consiste en HA, NA y M1 de gripe aviar. En otra realización dichas HA y NA de gripe aviar son H5N1, respectivamente. En otra realización dichas HA y NA son H9N2, respectivamente. En otra realización, dichas HA y NA de gripe aviar son H7N7, respectivamente. En otra realización, dichas HA y NA muestran actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dicho sujeto es un mamífero. En otra realización, dicho mamífero es un ser humano. En una realización más, dicha VLP se formula con un adyuvante o estimulante inmunitario.

En otra realización, dichas VLP de gripe aviar inducirán una respuesta inmunitaria en un vertebrado que es aproximadamente de 2 veces, aproximadamente de 4 veces, aproximadamente de 16 veces, aproximadamente de 32 veces, aproximadamente de 64 veces, aproximadamente de 128 veces más (o más alta) potente que antígenos de gripe aviar similares formulados similarmente a las vacunas inactivadas aprobadas, que tienen licencia comercial actualmente. Las formulaciones actuales comprenden vacunas de virus inactivados completos (por ejemplo, tratados con formaldehído), virus fraccionados (destruidos químicamente), y subunidades (glucoproteínas purificadas). Los métodos para determinar la potencia de una vacuna se conocen y son rutinarios en la técnica. Por ejemplo, los ensayos de microneutralización y los ensayos de inhibición de la hemaglutinación se pueden llevar a cabo para determinar la potencia de una vacuna de VLP aviar en comparación con los antígenos de gripe aviar formulados de forma similar a las vacunas inactivadas con licencia aprobadas actualmente para su comercialización. En una realización, dicho aumento en la potencia se nota cuando aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 9 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 35 µg, 40 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 50 µg, o más de las VLP y el antígeno formulado de forma similar de las vacunas inactivadas aprobadas actualmente para su comercialización se administran a un vertebrado (es decir, cantidades equivalentes

de HA y/o NA en una VLP con cantidades similares de HA y/o NA formuladas similarmente a las acunas inactivadas con licencia y/o cualquier otro antígeno). Las cantidades se pueden medir de acuerdo con el contenido de HA. Por ejemplo, 1 µg de una VLP de la invención es aproximadamente 1 µg de HA en una solución de VLP que comprende HA o se puede medir por el peso de VLP.

5 Las vacunas de gripe estacional se administran a seres humanos cada año para reducir la incidencia de casos de gripe cada año. Hoy en día, hay dos subtipos de gripe A y gripe B circulando en los Estados Unidos. Las vacunas actuales son, por lo tanto, trivalentes, para proporcionar protección contra las cepas que circulan actualmente. Cada año una cepa o variación diferente de una gripe vírica cambia. Por lo tanto, para la mayoría de los años se fabrica una nueva composición vacunal y se administra. Las vacunas inactivadas se producen por propagación del virus en 10 huevos de gallina embrionados. El líquido alantoideo se recolecta, y el virus se concentra y purifica, luego se inactiva. Por lo tanto, las vacunas del virus de gripe con licencia actualmente pueden contener cantidades traza de proteínas de huevo residuales y, por lo tanto, no deberían administrarse a personas que tienen hipersensibilidad anafiláctica a los huevos. Además, se tienen que organizar los suministros de huevos y se deben seleccionar las 15 cepas para la producción de vacunas con meses de adelanto de la próxima estación de gripe, limitando así la flexibilidad de esta estrategia y resultando a menudo en retrasos y acortamientos de la producción y la distribución. Además, algunas cepas de gripe no se replican bien en huevos embrionados de pollo lo que puede limitar las cepas de gripe que se pueden cultivar y formular en las vacunas.

20 Como se ha mencionado anteriormente, la VLP de la invención no necesita huevos para su producción. Estas VLP se hacen por media de un sistema de cultivo celular. Por lo tanto, la solicitud describe un método de inducción de una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un su jeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe estacional. Como se expuso anteriormente, virus de gripe estacional se refiere a las cepas víricas de gripe que se ha determinado que pasan por 25 la población humana durante una determinada estación de gripe basándose en las vigilancias epidemiológicas por los centros nacionales de gripe por todo el mundo. Dichos estudios y algunos virus de gripe aislados se envían a uno de los cuatro laboratorios de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de los cuales se localiza en los Centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) en Atlanta, para su ensayo detallado. Estos laboratorios ensayan qué tal reaccionan los anticuerpos producidos por la vacuna actual frente al virus circulante y 30 nuevos virus de gripe. Esta información, junto con la información sobre la actividad de la gripe, se resume y se presenta a un comité consultivo de la Administración de alimentos y fármacos de EE. UU (FDA) y en la reunión de la OMS. Estas reuniones dan como resultado la selección de tres virus (dos subtipos de virus de gripe A y uno de virus de gripe B) para integrarse en las vacunas de gripe para el siguiente otoño e invierno. La selección se produce en febrero para el hemisferio norte y en septiembre para el hemisferio sur. Habitualmente, una o dos de las tres cepas 35 de virus de la vacuna cambian cada año. En otra realización, dicha inducción de inmunidad sustancial reduce la duración de los síntomas de gripe.

La presente solicitud describe un método de inducción de una inmunidad sustancial contra una infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto que comprende la administración al menos de una dosis 40 eficaz de una VLP de gripe estacional, en que dicha VLP comprende una HA, NA y M1 de gripe estacional. Dicha VLP de gripe estacional Puede comprender proteínas de gripe estacional, en que dichas proteínas consisten en proteínas HA, NA y M1. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA). Dicho método de inducción de una inmunidad 45 sustancial contra la infección por el virus de la gripe estacional o al menos un síntoma de la misma en un sujeto puede comprender la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe estacional, en que dicha VLP consiste esencialmente en HA, NA y M1 de gripe estacional. Dichos VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables.

50 Un método de inducción de una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto puede comprender la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consiste en HA, NA y M1 de gripe estacional.

Dicha HA y/o NA de gripe aviar puede mostrar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, 55 respectivamente. Dicho sujeto puede ser un mamífero. Dicho mamífero puede ser un ser humano. Opcionalmente dicha VLP se formula con un adyuvante o estimulante inmunitario.

En general, las VLP de gripe estacional se administran en una cantidad suficiente para estimular una inmunidad sustancial para una o más cepas del virus de gripe estacional. Las VLP se pueden mezclar con otras VLP que 60 comprenden diferentes subtipos de proteínas de gripe (como se enumeran anteriormente). La formulación puede ser una formulación trivalente que comprende una mezcla de VLP con proteínas HA y/o NA de gripe estacional de al menos dos de gripe A y/o uno al menos uno del subtipo B. Dicho subtipo B se puede producir por el mismo método que se ha descrito anteriormente.

65 Opcionalmente, las VLP (VLP estacionales o aviares) pueden provocar una respuesta inmunitaria que proporcionará protección contra más de una cepa de virus de gripe. Esta protección cruzada de un vertebrado con una VLP de

gripe construida a partir de una cepa particular, de un subgrupo particular, puede inducir protección cruzada contra virus de gripe de diferentes cepas y/o subgrupo. Los ejemplos posteriores muestran que las VLP son capaces de inducir reactividad cruzada con diferentes cepas y/o subgrupos.

5 El sistema inmunitario humoral produce anticuerpos contra diferentes antígenos de gripe, de los que el anticuerpo específico de HA es el más importante para la neutralización del virus y por tanto la prevención de la enfermedad. Los anticuerpos específicos de NA son menos eficaces en la prevención de la infección, pero disminuyen la liberación de virus de las células infectadas. Los tejidos mucosos son el principal portal de entrada de muchos patógenos, incluyendo la gripe, y el sistema inmunitario mucoso proporciona la primera línea de defensa contra la
10 infección aparte de la inmunidad innata. La SIgA y, hasta cierto punto, la IgM son los anticuerpos neutralizantes principales que se dirigen contra los patógenos mucosos previniendo la entrada de agentes patógenos y pueden funcionar intracelularmente para inhibir la replicación del virus. Las secreciones nasales contienen anticuerpos neutralizantes particularmente para HA y NA de gripe, que son primariamente del isotipo IgA y se producen localmente. Durante la infección primaria, las tres clases de Ig principales (IgG, IgA e IgM) específicas contra HA se
15 pueden detectar por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas en lavados nasales, aunque se detectan más frecuentemente la IgA e IgM que la IgG. Tanto la IgA como, hasta cierto punto la IgM se segregan localmente activamente, mientras que la IgG se deriva como una secreción sérica. En sujetos que tienen una respuesta de IgA local, también se observa una respuesta de IgA sérica. La respuesta de IgA local estimulada por la infección natural dura durante al menos 3-5 meses, y las células de memoria encargadas de IgA específica de gripe se pueden
20 detectar localmente. La IgA también es el isotipo predominante de Ig en las secreciones locales tras la infección secundaria, las células de memoria se pueden detectar localmente. La IgA también es el isotipo Ig predominante en las secreciones locales tras la infección secundaria, y se detecta una respuesta de IgA en el suero en la infección posterior. La presencia de anticuerpos neutralizantes producidos localmente que se inducen por la vacuna de virus vivos se correlaciona con la resistencia a la infección y enfermedad tras la exposición al virus de tipo silvestre.

25 La resistencia a la infección de gripe o enfermedad se correlaciona con el nivel local y/o sérico de anticuerpos contra HA y NA. Los anticuerpos anti-HA son los más medidos comúnmente que se correlacionan con la protección contra la gripe (Cox *et al.*, 1999). Una respuesta protectora de anticuerpo sérico (con un título de inhibición de la hemaglutinación (HI) ≥ 40) se puede detectar en aproximadamente el 80 % de los sujetos tras la infección de gripe natural. Las células B que producen las tres clases de Ig principales están presentes en la sangre periférica de
30 sujetos normales (Cox *et al.*, 1994) y los individuos que padecen la infección de gripe. En los seres humanos, los anticuerpos séricos tienen un papel tanto en la resistencia a la enfermedad tras la infección experimental y la infección natural. Durante la infección primaria, las tres clases de Ig principales se pueden detectar en 10-14 días. Los niveles de IgA e IgM tienen un pico tras 2 semanas y luego comienzan a declinar, mientras que el nivel de IgG tiene el pico a las 4-6 semanas. Mientras que la IgG e IgM son dominantes en la respuesta primaria, la IgG e IgA predominan en la segunda respuesta inmunitaria.

Por lo tanto, la invención engloba una VLP de acuerdo con la invención para su uso en un método de inducción de una respuesta de anticuerpo sustancialmente protectora contra la infección por el virus de gripe o al menos de un
40 síntoma de la misma en un sujeto, que comprenden la administración de al menos una dosis eficaz de dicha VLP de gripe. En otra realización, dicha inducción de respuesta de anticuerpo sustancialmente protectora reduce la duración de los síntomas de gripe. En otra realización, un método de inducción de una respuesta de anticuerpos sustancialmente protectora contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP
45 comprende proteínas HA, NA y M1, de acuerdo con las reivindicaciones.

En otra realización, la invención comprende una VLP de acuerdo con la invención para su uso en un método de inducción de una respuesta de anticuerpos sustancialmente protectora contra la infección por el virus de la gripe o al menos una síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de
50 dicha VLP de gripe, en que dicha VLP consiste esencialmente en HA, NA y M1 de acuerdo con las reivindicaciones. Dichas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. En otra realización, dicha VLP de gripe comprende proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en proteínas HA, NA y M1 de acuerdo con las reivindicaciones. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus,
55 lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA). En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consiste en HA, NA y M1 de gripe de acuerdo con las reivindicaciones.

60 En otra realización, dicha HA y/o NA muestran actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dicho sujeto es un mamífero. En otra realización, dicho mamífero es un ser humano. En una realización más, dicha VLP se formula con una adyuvante o un estimulante inmunitario.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos
65 sustancialmente o parcialmente codificado por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen las regiones genéticas de inmunoglobulina

constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como miríadas de regiones genéticas de inmunoglobulina variables. Las cadenas ligeras se clasifican o bien en kappa o en lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulinas (anticuerpos) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente de 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables primariamente del reconocimiento antigénico. Los anticuerpos se encuentran como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados que se producen por digestión con varias peptidasas.

La inmunidad mediada por células también tiene un papel en la recuperación de la infección de gripe y puede prevenir las complicaciones asociadas a la gripe. Los linfocitos celulares específicos de gripe se han detectado en la sangre y las secreciones del tracto respiratorio inferior de sujetos infectados. La citólisis de las células infectadas de gripe está mediada por los CTL en concierto con los anticuerpos específicos de gripe y el complemento. La respuesta citotóxica primaria es detectable en la sangre tras 6-14 días y desaparece el día 21 en individuos infectados o vacunados (Ennis *et al.*, 1981). Los CTL específicos de gripe muestran especificidades de reacción cruzada en cultivos in vitro; así, lisan células infectadas con el mismo tipo de gripe pero no con otros tipos (por ejemplo virus de gripe A pero no de gripe B). La respuesta de CTL tiene reacción cruzada entre cepas de gripe A (Gerhard *et al.*, 2001) y es importante para minimizar la diseminación vírica en combinación con los anticuerpos (Nguyen *et al.*, 2001).

La inmunidad mediada por células también tiene un papel en la recuperación de la infección de gripe y puede prevenir las complicaciones asociadas a la gripe. Los linfocitos celulares específicos de gripe se han detectado en la sangre y las secreciones del tracto respiratorio inferior de sujetos infectados. La citólisis de las células infectadas de gripe está mediada por los CTL en concierto con los anticuerpos específicos de gripe y el complemento. La respuesta citotóxica primaria es detectable en la sangre tras 6-14 días y desaparece el día 21 en individuos infectados o vacunados (Ennis *et al.*, 1981). Los CTL específicos de gripe muestran especificidades de reacción cruzada en cultivos in vitro; así, lisan células infectadas con el mismo tipo de gripe pero no con otros tipos (por ejemplo virus de gripe A pero no de gripe B). La respuesta de CTL tiene reacción cruzada entre cepas de gripe A (Gerhard *et al.*, 2001) y es importante para minimizar la diseminación vírica en combinación con los anticuerpos (Nguyen *et al.*, 2001).

Por lo tanto, la invención engloba una VLP de la invención para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria celular sustancialmente protectora contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe de acuerdo con las reivindicaciones. En otra realización, un método de inducción de inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende la administración de al menos una dosis eficaz de una VLP de gripe, en que dicha VLP consiste en HA, NA y M1 de gripe de acuerdo con las reivindicaciones. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y puede contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc. pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de M1, HA y/o NA).

En otra realización, dicha M1, HA y/o NA muestra actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente. En otra realización dicho sujeto es un mamífero. En otra realización, dicho mamífero es un ser humano. En otra realización más, dicha VLP se formula con un adyuvante o estimulante inmunitario.

Como se ha mencionado anteriormente, las VLP de la invención previene o reduce al menos un síntoma de la infección de gripe en un sujeto. Los síntomas de gripe se conocen bien en la técnica. Incluyen fiebre, mialgia, dolor de cabeza, malestar general grave, tos no productiva, irritación de garganta, pérdida de peso y rinitis. Por lo tanto, el tratamiento de la invención comprende la prevención o reducción de al menos un síntoma asociado con la infección vírica de gripe. Una reducción de un síntoma se puede determinar subjetiva u objetivamente, por ejemplo, por la auto-evaluación por un sujeto, por una evaluación del médico o por la realización de una medición o ensayo apropiado (por ejemplo, temperatura corporal), que incluyen, por ejemplo, una evaluación de la calidad de vida, una progresión ralentizada de una infección de gripe o síntomas adicionales, una gravedad reducida de síntomas de gripe o ensayos adecuados (por ejemplo, el título de anticuerpos y/o un ensayo de activación de células T). La evaluación objetiva comprende tanto evaluaciones animales y humanas.

La estrategia principal que aboga el Comité Consultivo en Prácticas de Inmunización (ACIP) para el control de gripe ha sido la vacunación de personas con riesgo de complicaciones de gripe serias, en particular, las personas de ≥ 65 años de edad. Las epidemias de gripe anuales, sin embargo, siguen sin reducirse y son responsables de una carga sanitaria y financiera significativa a nuestra sociedad (Glaser *et al.*, 1996). En los últimos 20 años (1976-1999), se ha producido un significativo aumento en muertes en exceso por todas las causas asociadas a la gripe. Desde 1990 a 1999, el número anual de muertes de toda causa asociada a gripe superaba los 50.000 (Thompson *et al.*, 2003). A pesar del aumento en la cobertura de vacunación de personas de ≥ 65 años al 65 % durante la última década, no se ha observado una reducción correspondiente en las muertes en exceso de toda causa asociadas a gripe.

Por lo tanto, otra estrategia para la prevención y el control de la gripe es la vacunación universal de niños e individuos sanos. Los niños tienen altas tasas de infección, enfermedad atendida médicamente y hospitalización por gripe (Neuzil *et al.*, 2000). Los niños tienen un papel importante en la transmisión de la gripe en las escuelas, familias y comunidades. La vacunación con la gripe actual, vacunas de aproximadamente el 80 % de los escolares de una comunidad disminuyó la enfermedad respiratoria en adultos y las muertes en exceso en los ancianos (Reichert *et al.*, 2001). Este concepto se conoce como inmunidad comunitaria o “inmunidad de manada” y se cree que supone una parte importante de la protección de la comunidad contra la enfermedad. Debido a que la gente que se vacuna tiene anticuerpos que neutralizan el virus de gripe, hay mucha menos probabilidad de transmitir el virus de gripe a otras personas. Por lo tanto, incluso la gente que no se ha vacunado (y aquellos en los que se han debilitado las vacunaciones o cuyas vacunas no son totalmente eficaces) a menudo pueden protegerse por la inmunidad de manada debido a la gente vacunada a su alrededor no enferman. La inmunidad de manada es más eficaz según aumenta el porcentaje de gente vacunada. Se cree que aproximadamente el 95 % de la gente de la comunidad debe protegerse con una vacuna para conseguir la inmunidad de manada. La gente que no se inmuniza aumenta la probabilidad de que ellos y otros se pongan enfermos.

Por lo tanto, la invención engloba una VLP de acuerdo con la invención para su uso en un método de inducción de una inmunidad sustancialmente protectora contra la infección por el virus de gripe en una población o una comunidad con el fin de reducir la incidencia de las infecciones por el virus de gripe entre los individuos inmunocomprometidos o individuos no vacunados por la administración de VLP de la invención a una población de una comunidad. En una realización, la mayoría de los individuos sanos de una comunidad se inmunizan contra el virus de gripe administrando las VLP de la invención. En otra realización, las VLP de la invención son parte de una estrategia de “vacunación dinámica”, La vacunación dinámica es la producción estable de una vacuna de baja eficacia que está relacionada con una cepa pandémica emergente, pero que debido a una deriva antigénica no proporciona una protección completa en un mamífero (véase, Germann *et al.*, 2006). Debido a la incertidumbre sobre la identidad futura de una cepa pandémica, es casi imposible acopiar una cepa pandémica con buena coincidencia. Sin embargo, la vacunación con una vacuna de coincidencia baja pero potencialmente eficaz puede ralentizar la diseminación del virus pandémico y/o reducir la gravedad de los síntomas de una cepa pandémica del virus de la gripe.

La invención también engloba una vacuna que comprende una VLP de gripe de acuerdo con las reivindicaciones, en que dicha vacuna induce una inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma cuando se administra a un su jeto. En otra realización, dicha inducción de inmunidad sustancial reduce la duración de los síntomas de gripe. En otra realización, dicha vacuna induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende una VLP que comprende proteínas HA, NA y M1 de gripe de acuerdo con las reivindicaciones. En otra realización, dicha vacuna induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un su jet, comprende una VLP que consiste esencialmente n proteínas HA, NA y M1 de gripe de acuerdo con las reivindicaciones. Dichas VLP pueden comprender proteínas de gripe adicionales y/o proteínas contaminantes en concentraciones despreciables. En otra realización, dicha vacuna induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un su jeto, comprende una VLP que consiste en las proteínas HA, NA y M1 de gripe de acuerdo con las reivindicaciones. En otra realización, dicha vacuna induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de gripe o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende una VLP que comprende proteínas de gripe, en que dichas proteínas de gripe consisten en las proteínas HA, NA y M1 de acuerdo con las reivindicaciones. Estas VLP contienen HA, NA y M1 y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas de gripe adicionales (distintas de fragmentos de HA y/o NA).

En otra realización, dicha HA y/o NA muestra actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dicho sujeto es un mamífero. En otra realización, dicho mamífero es un ser humano. En otra realización más, dicha VLP se formula con un adyuvante o estimulante inmunitario. En otra realización dicha vacuna se administra a una mamífero. En otra realización más, dicho mamífero es un ser humano.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Materiales y métodos

Se expresaron genes de HA, NA y M1 del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en células de *Spodoptera frugiperda* (línea celular Sf-9S; ATCC PTA-4047) utilizando el sistema de expresión de bácmido de baculovirus. Los genes HA, NA y M1 se sintetizaron por transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ARN aislado del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (FIG. 1, 2 y 3). Para la transcripción inversa y la PCR, se utilizaron los oligonucleótidos cebadores específicos para los genes HA, NA y M1 del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Tabla 1). Las copias ADNc de estos genes se

clonaron inicialmente en el vector de subclonación bacteriano, pCR2.1TOPO. A partir de los tres plásmidos basado en el pCR2.1TOPO, los genes HA, NA y M1 se insertaron corriente abajo de los promotores AcMNPV polihedrina en el vector de transferencia de baculovirus, pFastBac1 (InVitrogen), dando como resultado tres plásmidos basados en pFastBac1: pHA, pNA y pM1 que expresan estos genes del virus de gripe, respectivamente. Luego se construyó un único plásmido pHAM basado en pFastBac1 que codificaba tanto los genes HA como M1, cada uno corriente abajo de un promotor polihedrina separado (FIG.4). La secuencia de nucleótidos del gen NA con las regiones adyacentes 5' y 3' en el plásmido pNA se determinó (SEC ID N° 1) (FIG. 1). Al mismo tiempo se determinaron también las secuencias de nucleótidos de los genes HA y M1 con las regiones adyacentes utilizando el plásmido pHAM (SEC ID N°s 2 y 3) (FIG. 2 y 3).

Finalmente, se clonó un fragmento de restricción ADN del plásmido pHAM que codifica los casetes de expresión tanto HA como M1 en el plásmido pNA. Esto daba como resultado el plásmido pNAHAM que codifica los genes HA, NA y M1 del virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (FIG. 4).

Se utilizó el plásmido pNAHAM para construir un baculovirus recombinante que contenía genes HA, NA y M1 del virus de gripe integrado en el genoma, cada uno corriente abajo de un promotor polihedrina de baculovirus separado. La infección de las células de insecto Sf-9S que lo permiten con el baculovirus recombinante resultante daba como resultado la co-expresión de estos tres genes de gripe en cada célula Sf-9S infectada con tal baculovirus recombinante.

Los productos de expresión en las células Sf-9S se caracterizaron a las 72 h tras la infección (p.i. por análisis SDS-PAGE, tinción con proteína Coomassie azul, y análisis de inmunotransferencia de Western utilizando anticuerpos específicos de HA y M1 (FIG. 5). El análisis de inmunotransferencia de Western se llevó a cabo utilizando anticuerpos de conejo producidos contra el virus de gripe tipo A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (CDC, Atlanta, Ga, EE. UU.), o anticuerpos monoclonales de ratón contra la proteína M1 de gripe (Serotec, RU). Las proteínas HA, NA y M1 de los pesos moleculares esperados (64 kD, 60 kD, y 31 kD, respectivamente) se detectaron por análisis de inmunotransferencia de Western. En comparación con la cantidad de proteína HA detectada en este ensayo, la proteína NA mostró una reactividad más baja con el suero de ratón contra el virus de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). La explicación de la cantidad de proteína NA detectable incluye, niveles más bajos de expresión de la proteína NA a partir de las células Sf-9S infectadas con el baculovirus recombinante en comparación con la proteína HA, reactividad más baja de la NA con este suero bajo condiciones de desnaturalización en el ensayo de inmunotransferencia de Western (debido a la eliminación de epítopos NA importantes durante la electroforesis en gel de unión a membrana), avidéz más baja de los anticuerpos NA en comparación con los anticuerpos HA, o una abundancia más baja de anticuerpos NA en el suero.

El medio de cultivo de las células Sf-9S infectadas con baculovirus recombinante que expresan proteínas HA, NA y M1 del A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) también se sondeó en cuanto a proteínas de gripe. Los sobrenadantes del cultivo clarificado se sometieron a ultracentrifugación a 27.000 rpm con el fin de concentrar los complejos proteicos altos moleculares de virus de gripe, tal como partículas subvíticas, VLP, complejos de VLP, y posiblemente, otros particulados auto-ensamblados que comprenden proteínas HA, NA y M1 de gripe. Los productos proteicos aglomerados se resuspendieron en solución salina fosfato tamponada (PBS, pH 7,2) y luego se purificaron por ultracentrifugación en gradientes discontinuos en etapas de sacarosa al 20-60 %. Las fracciones de los gradientes de sacarosa se recolectaron y se analizaron por análisis SDS-PAGE, análisis de inmunotransferencia de Western, y microscopía electrónica.

Las proteínas de gripe HA y M1 de los pesos moleculares esperados se detectaron en múltiples fracciones del gradiente de densidad de sacarosa por tinción en Coomassie azul y análisis de inmunotransferencia de Western (FIG. 6, Tabla 1). Esto sugiere que las proteínas víricas de gripe de las células Sf-9S se agregan en complejos de alto peso molecular, tales como capsómeros, partículas subvíticas, VLP, y/o complejos de VLP. Las proteínas NA aunque se detectan inconstantemente por tinción con Coomassie azul y análisis de inmunotransferencia de Western, que era debido probablemente a la incapacidad del suero anti-gripe de conejo para reconocer la proteína NA desnaturalizada en el ensayo de inmunotransferencia de Western, se detectaba constantemente en el ensayo de actividad enzimática de neuraminidasa (FIG 10).

TABLA 1

Fracción n°*	Título
1	<1:5001
3	<1:500
5	1:500
7	1:1000
9	1:2000
11	1:2000
12	1:4000

ES 2 543 056 T3

14	1:500
16	<1:500
PBS**	<1:500
A/Shangdong/9/93	<1:1000
*Fracción del gradiente de sacarosa al 20-60 %	
** Control Negativo	
*** Control Positivo	

Virus	Cepa	Gen	Cebador RT-PCR	SEC ID Nº
Tipo A	(H3N2) Sydney/5/97	Hemaglutinina (HA)	Directo	13
			Inverso	14
			Directo	15
		Neuraminidasa (NA)	Inverso	16
			Directo	17
		Matriz (M1)	Inverso	18
			Directo	19
		M2	Inverso	20
			Directo	21
		Nucleoproteína (NP)	Inverso	22
Tipo B	Harbin	Hemaglutinina (HA)	Directo	23
			Inverso	24
		Neuraminidasa (NA)	Directo	25
			Inverso	26

La presencia de VLP de alto peso molecular se confirmó por cromatografía de filtración en gel. Se cargó una alícuota de las fracciones de gradiente de densidad de sacarosa que contenía las proteínas víricas de gripe en una columna de Sepharosa CL-4B para el fraccionamiento basándose en la masa. La columna se calibró con dextrano azul 2000, dextrano amarillo, y vitamina B12 (Amersham Pharmacia) con pesos moleculares aparentes de 2.000.000; 20.000; y 1.357 daltons, respectivamente, y se determinó el volumen de hueco de la columna. Como se esperaba las proteínas víricas de gripe de alto peso molecular migraron en el volumen de hueco de la columna, que era característico de proteínas macromoleculares, tales como las partículas víricas. Las fracciones se analizaron por análisis de inmunotransferencia de Western para detectar las proteínas de gripe y de baculovirus. Por ejemplo, se detectaron las proteínas M1 en las fracciones de volumen de hueco, que también contenían proteínas de baculovirus (FIG. 7).

La morfología de las VLP de gripe y las proteínas de las fracciones del gradiente de sacarosa se esclarecieron por microscopía electrónica. Para la tinción negativa en el microscopio electrónico, las proteínas de gripe de dos fracciones del gradiente de densidad de sacarosa se fijaron en un 2 % de glutaraldehído en PBS pH 7,2. El examen en el microscopio electrónico de las muestras teñidas negativamente revelaron la presencia de complejos proteicos macromoleculares o VLP en ambas fracciones. Estas VLP presentaban diferentes tamaños que incluían diámetros de aproximadamente 60 y 80 nm y morfologías (esferas). También se detectaron complejos mayores de ambos tipos de partículas, como 53 pozos como partículas en forma de barra (FIG. 8). Todas las estructuras macromoleculares observadas tenían espinas (peplómeros) en sus superficies, lo que es característico de los virus de gripe. Como el tamaño y apariencia de las partículas de 80 nm eran similares a las partículas del virus de gripe tipo silvestre, estas estructuras probablemente representaban VLP, que tiene distintas similitudes con los viriones de gripe de tipo silvestre, incluyendo una geometría de partícula, arquitectura, número de triangulación, simetría y otras características similares. Las partículas más pequeñas de aproximadamente 60 nm pueden representar partículas subvíricas que se diferencia de las VLP tanto morfológica como estructuralmente. Un fenómeno similar de proteínas macromoleculares recombinantes de diferentes tamaños y morfologías se ha comunicado también en otros virus. Por ejemplo, el antígeno central recombinante (HBcAg) del virus de la hepatitis B forma partículas de diferentes tamaños que tienen diferente arquitectura y número de triangulación $T = 4$ y $T = 3$, respectivamente (Crowther *et al.*, 1994).

Para caracterizar las propiedades funcionales de las VLP de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), se ensayaron las muestras en un ensayo de hemaglutinación (FIG. 9) y un ensayo enzimático de neuraminidasa (FIG. 10). Para el análisis de hemaglutinación se mezclaron diluciones de 2 veces de VLP de gripe purificadas con 0,6 % de glóbulos rojos de cobaya y se incubaron a 4 °C durante 1 h o 16 h. Se inspeccionó la extensión de la hemaglutinación visualmente y se determinó y registró la dilución más alta de proteínas de gripe recombinantes capaz de aglutinar glóbulos rojos (FIG. 9). DE nuevo, muchas fracciones del gradiente de densidad de sacarosa mostraban actividad de hemaglutinación, sugiriendo que estaban presentes múltiples formas macromoleculares y monoméricas de proteínas de gripe. El título más alto que se detectó era de 1:4000. En un experimento de control, el virus de gripe A/Shangdong tipo silvestre demostró un título de 1:2000. El ensayo de hemaglutinación revelaba que la VLP recombinante consistía en proteínas HA, NA y M1 de virus de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) era funcionalmente activa. Esto sugiere que el ensamblaje, conformación y plegado de las subunidades proteicas HA en las VLP eran similares o idénticas a las del virus de gripe tipo silvestre.

De manera adicional, se llevó a cabo un ensayo enzimático de neuraminidasa en las muestras de VLP de H9N2 purificadas. La cantidad de actividad neuraminidasa en las fracciones de gradiente de densidad de sacarosa se determinaron utilizando fetuina como sustrato. En el ensayo de neuraminidasa, la neuraminidasa escindía el ácido siálico de las moléculas de sustrato y liberaban ácido siálico para su medición. Se añadió el reactivo arsenito para parar la actividad enzimática. Se determinó químicamente la cantidad de ácido siálico liberado con ácido tiobarbitúrico que produce un color rosa que era proporcional a la cantidad de ácido siálico libre. La cantidad de color (cromóforo) se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 549 nm. Utilizando este método, se observó actividad neuraminidasa en las fracciones de gradiente de sacarosa que contenían VLP de gripe (FIG. 10). Como se esperaba, la actividad se observaba en varias fracciones, con dos fracciones pico. Como control positivo, se utilizó un virus de gripe de tipo silvestre. El virus de gripe de tipo silvestre mostraba actividad enzimática neuraminidasa comparable a la de las VLP purificadas de gripe. Estos hallazgos corroboraban los resultados de HA con respecto a la conformación y sugería que las VLP purificadas de virus de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) eran funcionalmente similares al virus de gripe tipo silvestre.

Los resultados de los análisis y los ensayos anteriores indicaban que la expresión de proteínas HA, NA y M1 de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) era suficiente para el auto-ensamblaje y transporte de VLP funcionales de las células de insecto infectadas por baculovirus. Como estas VLP de gripe representaban proteínas estructurales de gripe auto-ensambladas y demostraban propiedades funcionales y bioquímicas similares a las del virus de gripe tipo silvestre, estas VLP de gripe conservaban conformaciones estructurales importantes incluyendo los epítomos de superficie necesarios para vacunas de gripe eficaces.

Ejemplo de referencia 2**Clonación por RT-PCR de genes víricos de gripe aviar de A/Hong Kong/1073/99**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar secuencias de ácido nucleico sintéticas capaces de dirigir la producción de proteínas víricas de gripe recombinantes. Tales secuencias de ácido nucleico sintéticas se obtienen por transcripción inversa y métodos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando el ARN genómico natural del virus de gripe aislado del virus. Para los fines de la presente solicitud, secuencia de ácido nucleico se refiere a ARN, ADN, ADNc o cualquier variante sintética de los mismos que codifica la proteína.

El virus de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) fue proporcionado por el Dr. K. Subbarao (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, Ga., EE. UU.). El ARN genómico vírico se aisló por extracción de ARN ácido fenol bajo condiciones de contención de Bioseguridad Nivel 3 (BSL3) en el CDC utilizando el reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, Calif. EE. UU.). Las moléculas de ADNc de los ARN víricos se obtuvieron por transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa MuLV (Invitrogen) y la PCR utilizaba cebadores oligonucleótidos específicos para las proteínas HA, NA y M1 y Taq I ADN polimerasa (Invitrogen) (Tabla 1). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector de subclonación bacteriano, pCR2.1TOPO. (Invitrogen), entre los sitios EcoRI lo que daba como resultado tres plásmidos recombinantes, que contienen clones ADNc de HA, NA y M1.

Ejemplo de referencia 3**Clonación por RT-PCR de genes víricos de gripe humana A/Sydney/5/94 (H3N2)**

El virus de gripe A/Sydney/5/94 (H3N2) se obtuvo del Dr. M. Massare (Novavax, Inc., Rockville, Md.). El ARN genómico vírico se aisló por el método de extracción ácido fenol bajo condiciones de contención BSL2 en Novavax, Inc. utilizando el reactivo Trizol LS (Invitrogen). Las moléculas de ADNc de los ARN víricos se obtuvieron por transcripción inversa y PCR utilizando cebadores oligonucleótidos específicos para las proteínas HA, NA, M1, M2 y NP (Tabla 1). Los fragmentos PCR se clonaron en el vector de subclonación bacteriano pCR2.1TOPO., entre los sitios EcoRI que daban como resultado cinco plásmidos recombinantes, que contenían los clones ADNc de HA, NA, M1, M2, y NP.

Ejemplo de referencia 4**Clonación de los ADNc víricos del A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en vectores de transferencia de baculovirus**

A partir de los plásmidos basados en pCR2.1TOPO, se subclonaron los genes de HA, NA o M1 en el vector de transferencia de baculovirus pFastBac1 (Invitrogen) en los sitios locus poliedro y Tn7 att y corriente abajo del promotor polihedrina de baculovirus y corriente arriba de la secuencia de señal de poliadenilación. Los genes víricos se ligaron con T4 ADN ligasa. Para el gen HA, se insertó un fragmento ADN HI-Kpn I del pCR2.1TOPO-HA en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Bam*HI-*Kpn*I. Para el gen NA, un fragmento ADN *Eco*RI del pCR2.1TOPO-NA se insertó en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Eco*RI. Para el gen M1, un fragmento de ADN *Eco*RI del pCR2.1TOPO-M1 se insertó en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Eco*RI. Se transformaron las bacterias competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) con estas reacciones de ligadura de ADN, que dieron como resultado colonias transformadas, y los clones bacterianos se aislaron. Los plásmidos basados en pFastBac1 resultantes, pFastBac1-HA, pFastBac1-NA, y pFastBac1-M1 se caracterizaron por mapeo enzimático de restricción en geles de agarosa (FIG. 4A). Las secuencias de nucleótidos de los genes clonados como se muestran en las FIG. 1-3 se determinaron por secuenciación de ADN automática. Los análisis de secuencia de ADN mostraban que los genes de gripe clonados HA, NA y M1 eran idénticas a las secuencias de nucleótidos de estos genes que se habían publicado anteriormente [genes HA, NA, y M1 de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Números de registro GenBank AJ404629, AJ404626, y AJ278646, respectivamente)].

Ejemplo de referencia 5**Clonación de ADNc víricos de gripe humana A/Sydney/5/94 (H3N2) en vectores de transferencia de baculovirus**

A partir de los plásmidos basados en pCR2.1TOPO, se subclonaron los genes de HA, NA, M1, M2, y NP en el vector de transferencia de baculovirus pFastBac1 en los sitios locus poliedro y Tn7 att y corriente abajo del promotor polihedrina de baculovirus y corriente arriba de la secuencia de señal de poliadenilación. Para el gen HA, se insertó un fragmento ADN HI-Kpn I del pCR2.1TOPO-hHA3 en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Bam*HI-*Kpn*I. Para el gen NA, un fragmento ADN *Eco*RI del pCR2.1TOPO-hNA se insertó en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Eco*RI. Para el gen M1, un fragmento de ADN *Eco*RI del pCR2.1TOPO-hM1 se insertó en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Eco*RI. Para el gen M2, un fragmento de ADN *Eco*RI del pCR2.1TOPO-hM2 se insertó en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Eco*RI. Para el gen NP, un fragmento de ADN *Eco*RI del pCR2.1TOPO-hNP se insertó en el plásmido ADN pFastBac1 digerido en *Eco*RI. Se transformaron las bacterias competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) con estas reacciones de ligadura de ADN, que dieron como resultado colonias transformadas, y

los clones bacterianos se aislaron. Los plásmidos basados en pFastBac1 resultantes, pFastBac1-hHA3, pFastBac1-hNA, pFastBac1-hM1, pFastBac1-hM2, pFastBac1-hNP se caracterizaron por mapeo enzimático de restricción en geles de agarosa. Las secuencias de nucleótidos de los genes clonados se determinaron por secuenciación de ADN automática. Los análisis de secuencia de ADN mostraban que los genes de gripe clonados HA, NA, M1, M2 y NP eran idénticas a las secuencias de nucleótidos de estos genes que se habían publicado anteriormente.

Ejemplo de referencia 6

Construcción de vectores de transferencia de baculovirus que codifican múltiples genes víricos de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99

Con el fin de construir los bácmidos vectores de transferencia basados en pFastBac1 que expresan múltiples genes de virus de gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), inicialmente un fragmento de ADN *Sna* BI-*Hpa* I del plásmido pFastBac1-M1 que contenía el gen M1 se clonó en el sitio *Hpa* I del pFastBac1-HA. Esto daba como resultado el plásmido pFastBac1-HAM que codifica los genes HA y M1 en casetes de expresión independientes y que se expresan bajo el control de promotores polihedrina separados.

Finalmente, un fragmento de ADN *Sna*BI-*Avr*II del pFastBac1-HAM que contenía los casetes de expresión HA y M1, se transfirió el plásmido ADN pFastBac1-NA digerido con *Hpa* I-*Avr* II. Esto daba como resultado el plásmido pFastBac1-NAHAM que codifica tres casetes de expresión independientes para la expresión de genes de gripe HA, NA y M1 y que se expresan bajo el control de promotores de polihedrina separados (FIG. 4B).

En otro ejemplo, el gen H3 del pFastBac1-hHA3 (véase el ejemplo 5) se clonó en el pFastBac1-NAHAM como un cuarto gen vírico de gripe para la expresión y producción de VLP heterotípicas de gripe.

Ejemplo de referencia 7

Generación de baculovirus recombinante multigénico que codifica genes NA, HA y M1 del virus gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 en células de insecto

El vector bácmido de transferencia multigénico pFastBac1-NAHAM se utilizó para generar un baculovirus recombinante multigénico que codificara los genes HA, NA y M1 de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) para la expresión en células de insecto. Los bácmidos ADN recombinantes se produjeron por recombinación específica del sitio en las secuencias polihedrina y Tn7 att ADN entre el ADN pFastBac1-NAHAM y el genoma de baculovirus AcMNPc albergado en las células de *E. coli* DH10BAC (Invitrogen) (FIG. 4B). El bácmido ADN recombinante se aisló por el método de plásmido ADN mini-prep y se transfirió a las células Sf-9S utilizando el lípido catiónico CELLFECTIN (Invitrogen). Tras la transfección, se aislaron los baculovirus recombinantes, se purificaron las placas, y se amplificaron en células de insecto Sf-9S. Las bases de virus se prepararon en células de insecto Sf-9S y se caracterizaron por la expresión de productos genéticos víricos HA, NA y M1 de gripe aviar. El baculovirus recombinante resultante se designó bNAHAM-H9N2.

Ejemplo de referencia 8

Expresión de proteínas recombinantes de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 en células de insecto

Las células de insecto Sf-9S se mantenían como cultivos en suspensión en matraces con agitado a 28 °C. Se infectaron en medio libre de suero (HyQ SFM, HyClone, Ogden, Utah) a una densidad celular de 2×10^6 células/ml con el baculovirus recombinante, bNAHAM-H9N2, a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 ufp/célula. La infección vírica transcurrió durante 72 h para permitir la expresión de las proteínas de gripe. La expresión de las proteínas HA y M1 de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en las células de insecto infectadas se confirmó por SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de Western. El análisis SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de gradiente lineal del 4-12 % NuPAGE (Invitrogen) bajo condiciones reducidas y desnaturizantes. Los anticuerpos primarios en el análisis de inmunotransferencia de Western eran policlonales de antisuero de conejo contra la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) obtenidos del CDC y monoclonales de antisuero murino contra la proteína M1 de gripe (Serotec, RU). Los anticuerpos secundarios para el análisis de inmunotransferencia de Western era fosfatasa alcalina conjugada con antisuero IgG de cabra producidos contra IgG de conejo o ratón (H + L) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md., EE. UU.). Los resultados de estos análisis (FIG. 5) indican que las proteínas HA y M1 se expresaban en las células de insecto infectadas con baculovirus.

Ejemplo de referencia 9

Purificación de Partículas recombinantes tipo virus de gripe aviar H9N2 y complejos proteicos macromoleculares

Los sobrenadantes de los cultivos (200 ml) de las células de insecto Sf-9S infectadas con el baculovirus recombinante bNAHAM-H9N2 que expresa productos genéticos HA, NA y M1 de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99

(H9N2) se recolectaron por centrifugación a baja velocidad. Los sobrenadantes del cultivo se clarificaron por centrifugación en una centrífuga superspeed Sorval RC-5B durante 1 h a 10.000 x g y 4 °C utilizando un rotor GS-3. Los virus y las VLP se aislaron de los sobrenadantes de los cultivos clarificados por centrifugación en una ultracentrífuga Sorval OTD-65 durante 3 h a 27.000 rpm a 4 °C. utilizando un rotor de cubeta oscilante Sorval TH-641. El aglomerado de virus se resuspendió en 1 ml de PBS (pH 7,2) que se cargó en un 20-60 % (p/v) de gradiente en etapas discontinuo de sacarosa, y se re-disolvió por centrifugación en una ultracentrífuga Sorval OTD-65 durante 16 h a 27.000 rpm a 4 °C utilizando un rotor Sorval TH-641. Se recolectaron fracciones (0,5 ml) desde la parte superior del gradiente de sacarosa.

Las proteínas de gripe en las fracciones del gradiente de sacarosa se analizaron por SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de Western como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6. Las proteínas HA y M1 se encontraron en las mismas fracciones del gradiente de sacarosa (FIG. 6) como se mostró por análisis de inmunotransferencia de Western y sugiere que las proteínas HA y M1 se asociaban como complejos proteicos macromoleculares. También se encontraban las proteínas HA y M1 en fracciones a lo largo del gradiente de sacarosa los que sugiere que estas proteínas víricas recombinantes estaban asociadas con complejos proteicos macromoleculares de diferentes densidades y composiciones.

Ejemplo de referencia 10

Análisis de VLP y proteínas recombinantes de gripe aviar H9N2 por cromatografía de filtración en gel

Las macromoléculas proteicas tales como las VLP y las proteínas monoméricas migran de manera diferente en las columnas cromatográficas de exclusión por tamaño y filtración en gel basándose en su tamaño de masa y forma. Para determinar si las proteínas de gripe recombinantes de las fracciones del gradiente de sacarosa eran proteínas monoméricas o complejos proteicos macromoleculares tales como VLP, se preparó una columna de cromatografía (7 mm x 140 mm) con un volumen de cama de resina de 14 ml de Sepharosa CL-4B (Amersham). La columna de exclusión por tamaño se equilibró con PBS y se calibró con Dextrano azul 2000, Dextrano amarillo, y vitamina B 12 (Amersham Pharmacia) con pesos moleculares aparentes de 2.000.000; 20.000; y 1.357, respectivamente, para determinar el volumen vacío de la columna. El Dextrano Azul 2000 se eluía de la columna en el volumen vacío (fracción de 6 ml) también. Como se esperaba, los complejos proteicos recombinantes de gripe se eluían de la columna en el volumen vacío (fracción de 6 ml). Este resultado era característico de un complejo proteico macromolecular de alto peso molecular tal como las VLP. Las proteínas víricas en las fracciones de la columna se detectaban por análisis de inmunotransferencia de Western como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6. Las proteínas M1 se detectaron en las fracciones de volumen vacío (FIG. 7). Como se esperaba las proteínas de baculovirus también estaban en el volumen vacío.

Ejemplo de referencia 11

Microscopía electrónica de VLP recombinantes de gripe

Para determinar si los complejos proteicos macromoleculares aislados en gradientes de sacarosa y que contienen las proteínas recombinantes de gripe aviar tenían morfologías similares a los viriones de gripe, se llevó a cabo el examen con microscopio electrónico de las muestras con tinción negativa. Los complejos proteicos recombinantes de gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) se concentraron y purificaron de los sobrenadantes de los cultivos por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa discontinuos como se describe en el Ejemplo 7. Se trataron alícuotas de las fracciones de gradiente de sacarosa con un 2 % de glutaraldehído en PBS, pH 7,2., absorbida en rejillas recubiertas con plástico/carbono recién desechado, y lavados en agua destilada. Las muestras se tiñeron con un 2 % de fosfotungstato sódico, pH 6,5, y se observaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión (Phillips). Las micrografías electrónicas de las muestras teñidas negativamente de complejos proteicos recombinantes de gripe aviar H9N2 de dos fracciones de gradiente de sacarosa mostraban partículas esféricas y en forma de barra (FIG. 8) a partir de dos fracciones de gradiente de sacarosa. Las partículas tenían diferentes tamaños (60 y 80 nm) y morfologías. Los complejos más grandes de ambos tipos de partículas también se detectaban, así como las partículas con forma de barra (FIG. 8). Todas las estructuras de los complejos proteicos observados mostraban espículas como proyecciones de superficie que se parecen a los peplómeros HA y NA del virus de gripe. Aunque el tamaño y apariencia de las partículas de 80 nm era similar a las partículas de virus de gripe tipo silvestre, estas estructuras probablemente representaban VLP de gripe recubiertas. Las partículas más pequeñas de aproximadamente 60 nm representaban probablemente partículas subvíricas que se diferencian de las VLP anteriores tanto morfológica como estructuralmente.

Ejemplo de referencia 12

Análisis de las características funcionales de las proteínas de gripe por el ensayo de hemaglutinación

Para determinar si las VLP y las proteínas de gripe purificadas poseían actividades funcionales, tales como la actividad de hemaglutinación y neuraminidasa, que eran características del virus de gripe, las VLP y proteínas de gripe purificadas se ensayaron en ensayos de hemaglutinación y neuraminidasa.

Para el ensayo de hemaglutinación, se prepararon una serie de diluciones de 2 veces de fracciones de gradiente de sacarosa que contenían las VLP de gripe o el control positivo de virus de gripe tipo A de tipo silvestre. Luego, se mezclaron con un 0,6 % de glóbulos rojos de cobaya en PBS (pH 7,2) y se incubó a 4 °C durante 1 a 16 h. Como control negativo se utilizó PBS. Se determinó la extensión de la hemaglutinación visualmente, y se determinó la dilución más alta de la fracción que era capaz de la aglutinación de los glóbulos rojos de cobaya (FIG. 9). El título de hemaglutinación más alto que se observó para las VLP y proteínas de gripe purificadas era de 1:4000, que era más alto que el título mostrado por el control de gripe tipo silvestre, que era de 1:2000.

Ejemplo de referencia 13

Análisis de las características funcionales de las proteínas de gripe por el ensayo de neuraminidasa

Se determinó la cantidad de actividad neuraminidasa en las fracciones de gradiente de sacarosa que contenían VLP de gripe por el ensayo de neuraminidasa. En este ensayo la NA (una enzima) actuaba sobre el sustrato (fetuina) y liberaba ácido siálico. El reactivo arsenito se añadía para parar la actividad enzimática. La cantidad de ácido siálico liberado se determinaba químicamente con el ácido tiobarbitúrico que producía un color rosa en proporción al ácido siálico libre. La cantidad de color (cromóforo) se medía en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 594 nm. Los datos, que se presentan en la FIG. 8, mostraban que se producía una cantidad significativa de ácido siálico por las fracciones que contenían VLP en los gradientes de sacarosa y que estas fracciones correspondían con las fracciones que mostraban actividad de hemaglutinación.

Ejemplo de referencia 14

Inmunización de ratones BALB/c con VLP funcionales homotípicas recombinantes de gripe H8N2

Se determinó la inmunogenicidad de las VLP recombinantes de gripe por inmunización de ratones seguida por el análisis de transferencia de Western de los sueros inmunes. Las VLP recombinantes (1 pg/inyección) que comprendían proteínas HA, NA y M1 víricas del virus de gripe aviar tipo A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) y purificadas en gradientes de sacarosa se inocularon por vía subcutánea en la región deltoidea de diez (10) ratones BLA/c hembras el día 0 y el día 28 (FIG. 11). Se administró PBS (pH 7,2) similarmente como control negativo en cinco (5) ratones. Los ratones se sangraron de la cavidad supraorbitaria el día -1 (pre-sangrado), el día 27 (sangrado primario), y el día 54 (sangrado secundario). Los sueros se recolectaron a partir de las muestras de sangre tras una noche de coagulación y centrifugación,

Para los análisis de transferencia de Western, 200 ng de virus tipo A H9N2 de gripe aviar inactivado o virus tipo A H9N2 de gripe aviar adaptado al frío, así como proteínas de referencia pre-teñidas See Blue Plus 2 (Invitrogen), se desnaturalizaron (95 °C, 5 minutos) y se sometieron a electroforesis bajo condiciones reducidas (19 mM de β -mercapto etanol) en un 4-12 % de geles NuPAGE en gradiente de poliacrilamida (Invitrogen) en tampón MES a 172 voltios hasta que desaparecía el rastro azul de colorante bromofenol. Para los geles de proteínas, las electroforesis de proteínas se visualizaban por tinción con reactivo Coomassie azul coloidal (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron desde el gel a membranas de nitrocelulosa en metanol por el procedimiento de transferencia de Western de referencia. Los sueros de los ratones inmunizados con VLP y conejos inmunizados con virus H9N2 de gripe aviar inactivado (sueros de control positivo) se diluyeron a 1:25 y 1:100, respectivamente, en solución PBS (pH 7,2) y se utilizaron como anticuerpo primario. Las membranas unidas a las proteínas, que se habían bloqueado con un 5 % de caseína, se hicieron reaccionar con los antisueros primarios durante 60 minutos a temperatura ambiente y agitado constante. Tras el lavado de las membranas de anticuerpo primario con solución salina fosfato tamponada que contenía Tween 20, se hizo reaccionar el anticuerpo secundario [anti-IgG murina de cabra --conjugado con fosfatasa alcalina (1:10.000) o anti-IgG de conejo de cabra--conjugada con fosfatasa alcalina (1:10.000)] durante 60 minutos con la membrana. Tras el lavado de las membranas del anticuerpo secundario con solución salina fosfato tamponada que contenía Tween 20, las proteínas unidas al anticuerpo en las membranas se visualizaron por el desarrollo con el sustrato cromogénico tal como NBT/BCIP (Invitrogen).

Los resultados del análisis de transferencia de Western (FIG. 12) eran las proteínas con pesos moleculares similares a las proteínas HA y M1 víricas (75 y 30 kD, respectivamente) unidas a los sueros de control positivos (FIG. 12B) y los sueros de los ratones inmunizados con las VLP recombinantes de gripe H9N2 (FIG. 12A). Estos resultados indicaban que las VLP recombinantes de gripe H9N2 solas eran inmunogénicas en los ratones por esta vía de administración.

Ejemplo de referencia 15

Inmunogenicidad de VLP de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) y estudio de exposición en ratones BALB/c

Se inmunizaron los ratones BALB/c con VLP de H9N2 (1 μ g de HA o 10 μ g de HA/dosis), con o sin 100 μ g de adyuvante Novasome, el día 0 y el día 21 y se desafiaron con virus infeccioso homólogo IN el día 57. Los ratones se sangraron los días 0, 27 y 57 y se ensayó el suero para detectar anticuerpos anti-HA por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando RBC de pavo, y gripe por ELISA. Los resultados de este estudio se muestran

desde la Figura 13 hasta la Figura 16.

Se inducían altos títulos de anticuerpos H9N2 tras una única inmunización (primaria) con vacuna VLP de H9N2 sin o con Novasomes y una dosis de 10 µg de VLP que contenía 1 µg de HA (Figura 13). Los títulos de anticuerpos específicos aumentaban aproximadamente medio a un log después de la inmunización de refuerzo.

Tras la inmunización y un refuerzo con 1 µg de HA en forma de VLP de H9N2 los niveles de HI del suero eran al nivel o por encima que en general se considera protector ($\log_2 = 5$) en todos los animales (Figura 14, panel inferior izquierdo). Las VLP de H9N2 formuladas con adyuvante Novasome aumentaban las respuestas de HI aproximadamente 2 veces tras la inmunización primaria y aproximadamente 4 veces tras el refuerzo (Figura 14, panel inferior derecho). La subunidad hemaglutinina de H9N2 purificada también inducía niveles protectores de anticuerpos HI tras el refuerzo y los Novasomes de nuevo aumentaban las respuestas de anticuerpos en la HI aproximadamente 2 veces tras la inmunización primaria y 4 veces tras el refuerzo (Figura 14, paneles superiores). El nivel de anticuerpos HI que se inducía con 10 µg de HA que se daba como subunidad vacunal era equivalente a 1 µg de HA que se presenta en forma de una VLP.

Además, la pérdida de peso era significativamente menor en los ratones inmunizados con VLP de H9N2 o con VLP más adyuvante, al compararse con los animales de control sin vacunar (Figura 15). No había una diferencia estadística en la pérdida de peso en los grupos inmunizados con VLP de H9N2 y con VLP de H9N2 más adyuvante Novasome.

Igualmente, los títulos de virus en pulmón a los 3 y 5 días tras la exposición al virus H9N2 se reducían significativamente en los ratones inmunizados con VLP de H9N2 (Figura 16). El día 3 cuando los títulos de virus de gripe alcanzan el pico en los tejidos pulmonares, los ratones inmunizados con VLP de H9N2 más Novasomes® tenían una reducción mayor del título vírico comparado con los ratones inmunizados con las VLP solas y los ratones de control sin vacunar.

Ejemplo de referencia 16

Inmunogenicidad de VLP A/Fujian/411/2002 (H3N2) y reacción cruzada entre varias cepas de gripe

Se inmunizaron ratones BALB/c con VLP A/Fujian/411/2002 (H3N2) (3,0, 0,6, 0,12 y 0,24 µg HA/dosis), dos veces IM e IN. Los ratones se sangraron los días 0 y 35. El suero se ensayó para detectar anticuerpos anti-HA por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando RBC de pavo, y en cuanto a anticuerpos antigripe por ELISA. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 17A, 17B y 17C. Estos resultados indican que se montó una respuesta inmunitaria tanto por vía IM como IN contra HA y NA.

Ejemplo de referencia 17

Determinación de los isotipos IgG en ratón tras la inoculación de VLP de H3N2

Se inocularon ratones con VLP por vía intramuscular e intranasal. A la semana 5 se recolectaron los sueros y se ensayaron para distinguir entre los isotipos IgG.

Los sueros se ensayaron en placas recubiertas con HA purificada (Protein Sciences) de A/Wyoming/3/2003 utilizando un ensayo ELISA. Se añadieron diluciones de cinco veces del suero en los pocillos y se incubaron las placas. A continuación, se añadieron anti-Ig de ratón biotinilado de cabra, o anti-IgG1 de ratón, anti-IgG2a de ratón, anti-IgG2b de ratón y anti-IgG3 de ratón. Luego se añadió a los pocillos estreptavidina-peroxidasa. Se detectaron los conjugados unidos. Los resultados se ilustran en las Figuras 18A y B. Estos resultados ilustran que la IgG2a era el isotipo más abundante en una respuesta inmunitaria contra VLP en el ratón.

Ejemplo de referencia 18

Estudio de intervalo de dosis de VLP A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en ratas SD

Se inmunizaron ratas SD (n = 6 por dosis) el día 0 y el día 21 con VLP purificadas de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) diluidas con PBS a pH neutro hasta 0,12, 0,6, 3,0 y 15,0 µg de HA o con PBS solo. Se tomaron muestras de sangre de los animales el día 0, día 21, día 35 y día 49 y se ensayó el suero por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) para detectar los anticuerpos funcionales capaces de inhibir la función de unión de la HA. La dosificación se basaba en el contenido de HA que se midió utilizando SDS-PAGE y densitometría de exploración de las VLP de H9N2. Los resultados de los títulos del ensayo de inhibición de la hemaglutinación se representan en la Figura 19. Una única dosis de 0,6 µg de VLP de H9N2 o dos dosis de 0,12 µg de HA producían niveles protectores de anticuerpos HI en ratas. Estos datos indican que una cantidad menor de HA puede inducir una respuesta protectora cuando dicha HA es parte de una VLP.

Ejemplo de referencia 19**Inmunogenicidad de la VLP A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)**

5 Se inmunizaron ratones BALB/c con VLP de H9N2 (0,12, 0,6 µg HA/dosis), con o sin 100 µg de adyuvante Novasome y alúmina, el día 0 y el día 21 y se desafiaron con el virus homólogo infeccioso por vía IN el día 57. Los ratones también se inmunizaron con 3,0 y 15,0 µg de HA/dosis (sin adyuvante). Los ratones se sangraron los días 0, 21, 35 y 49 con el suero ensayado respecto a anticuerpos anti-HA por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando RBC de pavo, y respecto a gripe por ELISA. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 20A y B.

Los resultados indican que se observó una respuesta inmunitaria total más robusta cuando se administraban las VLP con un adyuvante. Sin embargo, se provocaba una respuesta protectora con 0,12 µg de HA/dosis la semana 3 cuando se comparaba con la formulación de VLP con alúmina y la VLP sin adyuvante. También la semana 7, las VLP que comprendían Novasomes tenían un aumento de aproximadamente 2 log en el título HI en comparación de la VLP con alúmina. La robustez de la respuesta era similar a las VLP administradas a 3,0 y 15,0 µg de HA/dosis sin un adyuvante. Estos resultados indican que los Novasomes provocan una respuesta más robusta en comparación con la alúmina. Además, se puede conseguir una respuesta inmunitaria protectora con 25 x menos VLP cuando dichas VLP se administran en una formulación que comprende Novasomes.

También, en los datos de la dosis de 0,6 µg de HA/dosis, la formulación con Novasome tenía una respuesta aproximadamente 1,5 log mayor comparada con la alúmina. Las respuestas inmunitarias eran similares en magnitud a las VLP administradas en 3,0 y 15,0 µg de HA/dosis sin adyuvante. Estos resultados indican que con un adyuvante, se necesita administrar aproximadamente 5 x menos de VLP para conseguir una respuesta protectora.

También, la Figura 20B representa el título de HI de VLP de H9N2 utilizando diferentes formulaciones de Novasomes. Las siguientes son las fórmulas que se utilizaron en el experimento:

- Grupo 1: VLP de H9N2 (0,1 µg) (n=5)
 - Grupo 2: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ DCW neto) (n=5)
 - Grupo 3: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ DCW 1:3) (n=5)
 - Grupo 4: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ DCW 1:9) (n=5)
 - Grupo 5: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ DCW 1:27) (n=5)
 - Grupo 6: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ NVAX 1) (n=5)
 - Grupo 7: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ NVAX 2) (n=5)
 - Grupo 8: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ NVAX 3) (n=5)
 - Grupo 9: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ NVAX 4) (n=5)
 - Grupo 10: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ NVAX 5) (n=5)
 - Grupo 11: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ Alum-OH) (n=5)
 - Grupo 12: VLP de H9N2 (0,1 µg) c/ CpG) (n=5)
 - Grupo 13: PBS (0,6 µg) (n=5)
 - Grupo 14: VLP de H3 (0,6 µg) (n=5)
 - Grupo 15: VLP de H5 (0,6 µg) (n=8)
- H9: (Lote nº 11005)
 - DCW: Novasomes (Lote nº 121505-2, Polioxietileno-2-cetil éter, Colesterol, aceite de soja Superfmed, y Cloruro de Cetilpiridinio)
 - NVAX 1: B35P83, MF-59 replica (Escualeno, Polisorbato, y Span)
 - NVAX 2: B35P87 (Aceite de soja, Brij, Colesterol, Pluronic F-68)
 - NVAX 3: B35P88 (Aceite de soja, Brij, Colesterol, Pluronic F-68, and Polietilenimina)
 - NVAX 4: B31P60 (Escualeno, Brij, Colesterol, Ácido oleico)
 - NVAX 5: B31P63 (Aceite de soja, monoestearato de Glicerilo, Colesterol, Polisorbato)
 - CpG: (Lote nº1026004)
 - H5: (Lote nº22406)

La Figura 21 representa la curva de respuesta a la dosis de las VLP de H9N2. Estos datos indican que una dosis de VLP de 0,6 µg de HA/dosis es la mínima para provocar una respuesta inmunitaria protectora en ratones tras 3 semanas.

Ejemplo de referencia 20**Materiales y métodos de los estudios en Hurones**

- 5 Los hurones se obtuvieron en Triple F Farms (FFF, Sayre, PA). Todos los hurones obtenidos tienen un título HAI de menos de 10 unidades de hemaglutinación. Aproximadamente dos días antes de la vacunación, se les implantó a los animales un transponder de temperatura (BioMedic Data Systems, Inc.). Los animales (6 animales por grupo) se vacunaron el día 0 o con (1) PBS (control negativo, grupo uno), (2) VLP de H3N2 de gripe @ 15 µg de H3 (grupo 2), (3) VLP de H3N2 de gripe @ 3 µg de H3 (grupo 2), (4) VLP de H3N2 de gripe @ 0,6 µg de H3 (grupo 3), (5) VLP de H3N2 de gripe @ 0,12 µg de H3 (grupo 5), o (6) rH3HA @ 15 µg (grupo 6). El día 21 los animales se reforzaron con vacuna. Los animales se sangraron los días 0 (antes de la vacunación), día 21 (antes del refuerzo vacunal), y el día 42. Los animales se evaluaron en cuanto a signos clínicos de efectos adversos de la vacuna una vez a la semana durante el periodo de estudio. Se llevaron a cabo estudios similares con otras VLP de gripe.

15 Niveles de HAI en sueros de hurón

- Se obtuvieron sueros de hurón en FFF, que se trataron con la Enzima destructora del receptor (RDE) y ensayados en cuanto al ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) por procedimientos de referencia (Kendal *et al.* (1982)). Todos los hurones que se eligieron para el estudio tenían un ensayo negativo (HAI = 10) para anticuerpos pre-existentes a los virus circulantes actualmente de gripe humana (A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A panamá/2007/99 (H3N2), A/Wellington/01/04 (H2N3) y B/Sichuan/379/99 y H5N1).

Hurones

- 25 Se obtuvieron de FFF, hurones Fitch machos (*Mustela putorius furo*), castrados y desodorizados, no expuestos previamente a la gripe de aproximadamente 8 meses de edad. Los animales se alojaron en jaulas de conejo de acero inoxidable (Shor-line, KS) que contenían una cama de animales de laboratorio SAni chips (P.J. Murphy Forest Products, NJ). Los hurones se alimentaron con Dieta para hurones Global Teklad (Harlan Teklad, WI) y agua dulce ad libitum. Los paneles se cambiaban tres veces a la semana, y se limpiaban las jaulas dos veces a la semana.

30 Vacunaciones y recolección de sangre de los hurones

- La vacuna, VLP de H3N2 de gripe o VLP de H9N2 de gripe y los controles, por ejemplo, rH3NA (A/Wyoming/3/2003) y PBS (control negativo) se guardaron a 4 °C antes de su uso. Para las mayorías de los estudios, se vacunaron por vía intramuscular 6 grupos de hurones (N-6/grupo) con la concentración de vacuna o de control con un volumen de 0,5 ml.

- Antes de la recolección de sangre y la vacunación, los animales se anestesiaron con una inyección intramuscular en el interior del muslo con una solución de Ketamina (25 mg/kg, Atropina (0,05 mg/kg) y Xylacina (2,0 mg/kg) "KAX". Una vez anestesiados, los hurones se posicionaron en decúbito dorsal y se recolectó la sangre (con un volumen entre 0,5 y 1,0 ml) de la vena cava anterior utilizando una aguja de 23 gauge de 1" conectada a una jeringa de tuberculina. La sangre se transfirió a un tubo que contenía un separador de suero y activación del coágulo y se permitió coagular a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron y se retiró el suero y se congeló a -80 °C. La sangre se recolectó antes de la vacunación (día 0), antes del refuerzo (día 21) y el día 42 y se ensayaron por el ensayo HAI.

Seguimiento de los hurones

- Se midieron las temperaturas semanalmente aproximadamente a la misma hora durante el periodo de estudio. Los valores pre-vacunales se promediaron para obtener una línea base de temperaturas para cada hurón. El cambio de temperatura (en grados Fahrenheit) se calculó en cada punto de tiempo para cada animal. Los hurones se examinaron semanalmente en cuanto a signos clínicos de efectos vacunales adversos, que incluían la temperatura, pérdida de peso, pérdida de actividad, descarga nasal, estornudos y diarrea. Se utilizó un sistema de puntuación basado en el descrito por Reuman *et al.* (1989) para evaluar el nivel de actividad donde 0 = alerta y activo; 1 = alerta pero activo solo cuando se estimula; 2 = alerta pero no activo cuando se estimula. Basándose en las puntuaciones para cada animal de un grupo, se calculó un índice de inactividad relativa como $\Sigma(\text{día 0-día 42}) [\text{puntuación de actividad} + 1] / \Sigma(\text{día 0-día 42})$, donde n es igual al número total de observaciones. Un valor de 1 se añadió a cada puntuación de base de forma que se pudiera dividir la puntuación de "0" or un denominador, resultando un valor del índice de 1,0.

Preparaciones del suero

- Los sueros en general tenían bajos niveles de inhibidores no específicos de hemaglutinación. Para inactivar estos inhibidores no específicos, los sueros se trataron con (RDE) antes de ensayarse. En resumen, se añadieron tres partes de RDE a una parte de suero y se incubaron una noche a 37 °C. El RDE se inactivó por incubación a 56 °C

durante aproximadamente 30 minutos. Después de la inactivación de RDE, se añadió PBS a la muestra para obtener una dilución del suero final de 1:10 (RDE-Tx). El suero diluido RDE-Tx se almacenó a 4 °C antes de ensayarlo (durante 7 días) o se almacenó a -20 °C.

5 Preparación de eritrocitos de pavo:

Los virus de gripe humana se une a los receptores del ácido siálico que contienen enlaces ácido N-acetilneuramínico α 2,6-galactosa. Los virus de gripe aviar se unen a los receptores de ácido siálico que contienen enlaces ácido N-acetilneuramínico α 2,3-galactosa (enlaces α 2,3) y expresan tanto enlaces α 2,3 como α 2,6. Los eritrocitos de pavo (TRBC) se utilizan para el ensayo HAI ya que el A/Fujian es un virus de gripe humana. Los TRBC se ajustan con PBS para alcanzar un volumen del 0,5 %/ volumen de suspensión. Las células se mantienen a 4 °C y se utilizan en las 72 h de la preparación.

Ensayo HAI

El ensayo HAI se adaptó del manual de vigilancia de gripe basando en el laboratorio CDC (Kendal et al. (1982) Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia.).

Los sueros RDE-Tx se diluyeron 2 veces seriadamente en placas microtiter con fondo en V. Se ajustó un volumen igual de virus, aproximadamente a 8 HAU/50 μ l y se añadió a cada pocillo. Las placas se cubrieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos seguido por la adición de TRBC al 0,5 %. Las placas se mezclaron por agitación, se cubrieron, y se permitió que los TRBC se asentaran durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se determinó el título HAI por dilución recíproca de la última fila que contenía TRBC no aglutinados. Se incluyeron en cada placa controles de suero positivo y negativo.

Ejemplo de referencia 21

Estudio de intervalo de dosificación de VLP A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en hurones

Los hurones, serológicamente negativos por inhibición de la hemaglutinación para virus de gripe, se utilizaron para evaluar el título de anticuerpos e HI tras la inoculación con VLP de H9N2. Los hurones se sangraron los días 0, y 21 con el suero ensayado en cuanto a anticuerpos anti-HA por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando RBC de pavo, y en cuanto a anticuerpos anti-gripe por ELISA. Los resultados se ilustran en la Figura 22. Estos resultados muestran títulos de HI que corresponden a los niveles de anticuerpos protectores a dosis de VLP de 1,5 y 15 μ g.

Ejemplo de referencia 21

Vacunación con VLP de H3N2 en hurones

Se vacunaron los hurones el día 0, y se les puso un refuerzo el día 21 con diferentes cepas de VLP de H3N2 a diferentes dosificaciones (dosificaciones de HA 0,12, 0,6, 3,0, 15,0 μ g). El control positivo era rH3N2 a 15 μ g y el control negativo es PBS solo. Los sueros, como se ha descrito anteriormente, se tomaron de los hurones el día 0 antes de la vacunación, el día 21 (antes del refuerzo) y el día 42. Se llevó a cabo un ensayo de HI en las muestras de suero para determinar si había una respuesta inmunitaria contra las VLP. Estos datos se ilustran en la Figura 23. Estos datos indican que las VLP de H3N2, cuando se introducen en los hurones, inducen una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, las VLP de H3N2 son inmunogénicas en hurones.

Ejemplo 22

RT-PCR y clonación de genes HA, NA y M1 del virus de gripe A/Indonesia/5/05 (H5N1)

Se extrajo el ARN vírico del clado 2 del virus de gripe, cepa A/Indonesia/5/05 (H5N1) utilizando Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) bajo condiciones de contención BSL-3. La transcripción inversa (RT) y PCR se llevaron a cabo en el ARN vírico extraído utilizando un sistema RT-PCR de una etapa (Invitrogen) con cebadores oligonucleótidos específicos del gen. Se utilizaron los siguientes pares de cebadores para la síntesis de la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), genes de matriz (M1) del H5N1, respectivamente:

5'-AACGGTCCGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTC-3' (SEC ID 4) y
 5'-AAAGCTTTTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACG-3' (SEC ID 5) (HA);
 5'-AACGGTCCGATGAATCCAAATCAGAAGATAAT-3' (SEC ID 6) y
 5'-AAAGCTTCTACTTGTCAATGGTGAATGGCAAC-3' (SEC ID 7) (NA); y
 5'-AACGGTCCGATGAGTCTTCTAACCGAGGTC-3' (SEC ID 8) y
 5'-AAAGCTTTCATTGAATCGCTGCATCTGCAC-3' (SEC ID 9) (M1) (los codones ATG están subrayados).

A continuación de la RT-PCR, se clonaron los fragmentos de ADNc que contenían los genes de gripe HA, NA y M1 con pesos moleculares de 1,7, 1,4, y 0,7 kb, respectivamente, en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Las secuencias de nucleótidos de los genes HA, NA, y M1 se determinaron por secuenciación de ADN. Una estrategia similar se siguió para clonar un clado 1 H5N1 del virus de gripe a partir de Vietnam/1203/2003.

Ejemplo 23

Generación de baculovirus recombinantes que comprenden H5N1

El gen HA se clonó como un fragmento de ADN *RsrII-HindIII* (1,7 kb) corriente abajo del promotor polihedrina AcMNPV con el vector bácido de transferencia pFastBac1 (Invitrogen) digerido con *RsrII* y *HindIII*. De manera similar, los genes NA y M1 se clonaron como fragmentos de ADN *EcoRI-HindIII* (1,4 y 0,8 kb, respectivamente) en el plásmido ADN pFastBac1 digerido con *EcoRI-HindIII*. Los tres plásmidos de transferencia de baculovirus pHA, pNA, y pM1 que contenían los genes HA, NA y M1 del virus de gripe A/Indonesia/5/05 (H5N1), respectivamente, se utilizaron para generar bácididos recombinantes.

Los bácididos se produjeron por recombinación homóloga específica del sitio siguiendo la transformación de plásmidos bácididos de transferencia que contienen genes de gripe en células competentes *E. coli* DH10Bac, que contenían el genoma de baculovirus AcMNPV (Invitrogen). El bácidido ADN recombinante se transfectó en células de insecto Sf9.

Secuencias de nucleótidos de los genes HA, NA y M1 del Indonesia/5/05.

HA (SEC ID 10)

```
ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGC
ATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAAGCGTT
ACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTA
GATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAAC
CCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAAT
CCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTA
TTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGAT
CATGAAGCCTCATCAGGAGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTT
AGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTAC
AATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCG
GCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACA
CTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGA
AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAT
GGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATT
ATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCG
ATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAA
TATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAG
AGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGG
CAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTAC
GCTGCAGACAAAAGAAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCA
ATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAA
AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTAT
AATGCCGAACCTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAAAT
GTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGT
AACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAAC
GGAACGTACAACTATCCGCAGTATTGAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGT
GGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCG
AGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGA
TCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA
```

NA (SEC ID 11)

ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATTGGATCAATCTGTATGGTAATTGGAATAGTT
 AGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAATATGGGTGAGTCATTCAATTCAGACA
 GGAATCAACACCAAGCTGAATCAATCAGCAATACTAACCCTCTTACTGAGAAAGCTGTG
 GCTTCAGTAACATTAGCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAGAGGATGGGCTGTACAC
 AGTAAGGACAACAATATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATTAGAGAGCCG
 TTCATCTCATGCTCCCACCTGGAATGCAGAACTTTCTTCTGACTCAGGGAGCCTTGCTG
 AATGACAAGCACTCCAACGGGACTGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGT
 TGTCTGTGGGTGAGGCTCCCTCTCCATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCA
 GCAAGTGCTTGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAAT
 GAGGCTGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGG
 AACACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGCTCTTGCTTTACT
 GTAATGACTGATGGACCAAGTGATGGGCAGGCATCATATAAGATCTTCAAATGGAAAAA
 GGAAAAGTGGTCAAATCAGTCGAATTGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC
 TGTATATCCTGATGCCGGCGAAATCACATGTGTTTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAAT
 AGGCCATGGGTATCTTTCAATCAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGTGGG
 GTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGCCCGATGTCCCCT
 AACGGGGCATATGGGGTAAAGGGTTTTCAATTTAAATACGGCAATGGTGTGGATCGGG
 AGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGG
 ACTGGAACGGACAGTAGCTTTTCAGTGAAACAAGATATAGTAGCAATAACTGATTGGTCA
 GGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGATTAGATTGCATAAGACCT
 TGTTTCTGGGTTGAGTTAATCAGAGGGCGGCCCAAAGAGAGCACAAATTTGGACTAGTGGG
 AGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAAATAGTGACACTGTGAGTTGGTCTTGGCCAGACGGT
 GCTGAGTTGCCATTCACCATTGACAAGTAG

5

M1 (SEC ID 12)

ATGAGTCTTCTAACCAGAGGTGCGAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTC
 AAAGCCGAGATCGCGCAGAACTTGAAGATGTCTTTGCAGGAAAGAACACCGATCTCGAG
 GCTCTCATGGAGTGGCTGAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAAGGGATTTTG
 GGATTTGTATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTC
 CAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATAT
 AAGAAGCTGAAAAGAGAAATAACATTCCATGGGGCTAAAGAGGTTTCACTCAGCTACTCA
 ACCGGTGCATTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGACTACG
 GAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTCACAGCATCGG
 TCTCACAGGCAGATGGCAACTATACCAACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTG
 CTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCG
 GAAGCCATGGAGGTCGCTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGA
 ACTCATCCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAATTTGCAGGCCCTAC
 CAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA

- 10 Un gen clonado HA, pH5, contenía dos cambios de nucleótidos, nt nº 1172 y nt nº 1508 (en el wt), cuando se comparaba con la secuencia del gen HA de tipo silvestre. Se siguió una estrategia similar para construir y crear el clado 1 del virus de gripe H5N1 de las VLP Vietnam/1203/2003 (véase posteriormente). Los alineamientos de nucleótidos del pH5 y las secuencias de aminoácidos son los siguientes.

ES 2 543 056 T3

```

wt      1 .....ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAG 31  sec id 10
          |||
PHA5    51 ATTGCGCCCTTAACGGTCCGATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAG 100 sec id 56
          .
          32 TCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTGTCATTGGTTACCATGCAAACAAT 81
          |||
          101 TCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTGTCATTGGTTACCATGCAAACAAT 150
          .
          82 TCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACA 131
          |||
          151 TCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACA 200
          .
          132 TGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAG 181
          |||
          201 TGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAG 250

```

ES 2 543 056 T3

```

182 ATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTC 231
|||||
251 ATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTC 300
|||||
232 CTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTA 281
|||||
301 CTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTA 350
|||||
282 CATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTT 331
|||||
351 CATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTT 400
|||||
332 TCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTT 381
|||||
401 TCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTT 450
|||||
382 GAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTC 431
|||||
451 GAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTC 500
|||||
432 ATCAGGAGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTA 481
|||||
501 ATCAGGAGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTA 550
|||||
482 GAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAGTACATACCCAACAATAAAG 531
|||||
551 GAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAGTACATACCCAACAATAAAG 600
|||||
532 AAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGAAT 581
|||||
601 AAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGAAT 650
|||||
582 TCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAA 631
|||||
651 TCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAA 700
|||||
632 CCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCA 681
|||||
701 CCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCA 750
|||||
682 AAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGGATGGAGTT 731
|||||
751 AAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGGATGGAGTT 800
|||||
732 CTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATG 781
|||||
801 CTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATG 850
|||||
782 GAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGAC 831
|||||
851 GAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGAC 900
|||||
832 TCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTG 881
|||||
901 TCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTG 950
|||||
882 TCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATAC 931
|||||
951 TCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATAC 1000

```

```

932 ACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTA 981
|||||
1001 ACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTA 1050
|||||
982 GTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAA 1031
|||||
1051 GTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAA 1100
|||||
1032 AAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTATAGAGGGAGGATGGC 1081
|||||
1101 AAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTATAGAGGGAGGATGGC 1150
|||||
1082 AGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGG 1131
|||||
1151 AGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGG 1200
|||||
1132 AGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGT 1181
|||||
1201 AGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATGGATGGAGT 1250
|||||
1182 CACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGG 1231
|||||
1251 CACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGG 1300
|||||
1232 CCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAAC 1281
|||||
1301 CCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAAC 1350
|||||
1282 AAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAC 1331
|||||
1351 AAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAC 1400
|||||
1332 TCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATG 1381
|||||
1401 TCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATG 1450
|||||
1382 TTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAG 1431
|||||
1451 TTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAG 1500
|||||
1432 GAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATG 1481
|||||
1501 GAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATG 1550
|||||
1482 TATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACACTATCCGCAGTATTCAGAAG 1531
|||||
1551 TATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTGCAACTATCCGCAGTATTCAGAAG 1600
|||||
1532 AAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAAATTGGAATCAATA 1581
|||||
1601 AAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAAATTGGAATCAATA 1650
|||||
1582 GGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGC 1631
|||||
1651 GGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGC 1700
|||||
1632 ACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGAT 1681
|||||
1701 ACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGAT 1750

```

1682 CGTTACAATGCAGAATTTGCATTAA..... 1707
 |||
 1751 CGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGCTTTAAGGGCGAATTCCAGCA 1800

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Hemaglutinina

PHA5	1	MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILE	50	sec	id	57
wt	1	MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILE	50	sec	id	58
	51	KTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKAN	100			
	51	KTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKAN	100			
	101	PTNDLCYPGSEFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA	150			
	101	PTNDLCYPGSEFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA	150			
	151	CPYLGSPSFRRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA	200			
	151	CPYLGSPSFRRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA	200			
	201	AEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIAATRSKVNQSGRMEFFWTILK	250			
	201	AEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIAATRSKVNQSGRMEFFWTILK	250			
	251	PNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA	300			
	251	PNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA	300			
	301	INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFG	350			
	301	INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFG	350			
	351	AIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAMDGVTNKVNS	400			
	351	AIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNS	400			
	401	IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLOVWTYNAELLVIMEN	450			
	401	IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLOVWTYNAELLVIMEN	450			
	451	ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRN	500			
	451	ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRN	500			
	501	GTCNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMA	550			
	501	GTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMA	550			
	551	GLSLWMCSNGSLQCRICI	568			
	551	GLSLWMCSNGSLQCRICI*	569			

5

Ejemplo 26

Generación de genes HA, NA, y M1 optimizados de A/Indonesia/5/05 para la expresión eficaz en células Sf9.

- 10 Se derivaron los siguientes polipéptidos de los nucleótidos de codón optimizado que correspondían al gen HA de Indonesia/5/05 (véase el ejemplo 31). Los nucleótidos de codón optimizado se diseñaron y produjeron (Geneart GMBH, Regensburg, FRG) de acuerdo con los métodos desvelados en la publicación de patente de EE. UU. 2005/0118191. Véase el Ejemplo 31 para las secuencias de ácidos nucleicos.

Vac2-hac-opt (secuencias de aa sin modificar) (SEC ID 27)

```
MEKIVLLLA I VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVW TY NAELLVLMEN
ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
GLSLWMC SNG SLQCRICI*
```

5 Vac2-hac-spc-opt (modificado, péptido de señal de Quitinasa, subrayado) (SEC ID 28)

```
Mplykllnlwlvavsnai p DQICIGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVW TY NAELLVLMEN
ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
GLSLWMC SNG SLQCRICI*
```

Vac2-hac-sph9-opt (modificado, péptido de señal de H9, subrayado)

10

```
METISLITIL LVVTASNA DQICIGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVW TY NAELLVLMEN

ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
GLSLWMC SNG SLQCRICI*
```

15 Vac2-hac-cs-opt (-es el sitio de escisión modificado) (SEC ID 30)

```
MEKIVLLLA I VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
INSSMPFHNI HPLTIGEC PK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE S---RGLFG
AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVW TY NAELLVLMEN
ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRD NAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
GLSLWMC SNG SLQCRICI*
```

Los siguientes polipéptidos que corresponden a los genes NA y M1 de codón optimizado, sin modificar también se sintetizaron.

5 Vac2-naj-opt (neuraminidasa) (SEC ID 31)

```
MNPNQKIITI GSICMVGIV SLMLQIGNMI SIWVSHSIQT GNQHQAESIS
NTNPLTEKAV ASVTLAGNSS LCPIRGWAVH SKDNNIRIGS KGDVFVIREP
FISCSHLECR TFFLTQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY
NSRFESVAWS ASACHDGT SW LTIGISGPDN EAVAVLKYNG IITDTIKSWR
NNILRTQESE CACVNGSCFT VMTDGP SDGQ ASYKIFKMEK GKVVKSVELD
APNYHYECS CYPDAGEITC VCRDNWHGSN RPWVSFNQNL EYQIGYICSG
VFGDNPRPND GTGSCGPMSP NGAYGVKGFS FKYGNVWIG RTKSTNSRSG
FEMIWDPNGW TGT DSSFSVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTG LDCIRP
CFWVELIRGR PKESTIWTS G SSISFCGVNS DTVSWSWPDG AELPFTIDK*
```

10 Vac2-mc-opt (matriz) (SEC ID 32)

```
MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDRAVKLY
KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGT VTT EVA FGLVCAT
CEQIADSQHR SHRQMATITN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THPNSSAGLR DN LLENLQAY QKRMGVQMQR
FK*
```

Los genes HA, NA y M1 de codón optimizado, sintéticos se subclonaron en el plásmido de transferencia pFastBac1 utilizando los sitios *Bam*HI and *Hind*III, como se ha descrito anteriormente. Los bácmidos recombinantes para la expresión en células Sf9 de los genes sintéticos HA, NA y M1 se generaron como se ha descrito anteriormente, utilizando la cepa de *E. coli* DH10Bac (Invitrogen).

Ejemplo de referencia 24

20 **Clonación del clado 1 del virus de gripe A/Vietnam/1203/04 (H5N1) por RT-PCR**

Los genes HA, NA y M1 se clonaron por RT-PCR de acuerdo con el método descrito anteriormente. Las secuencias posteriores son comparaciones entre el gen publicado comparado con los genes clonados.

25 El gen HA para el clado 1 del A/Vietnam/1203/04 (H5N1)

Calle superior: Gen HA Reg. nº AY818135 (SEC ID 36)

Calle inferior: Gen HA de Novavax A/Vietnam/1203/2009 (H5N1) (SEC ID 37)

```

1 .....ATGGAGAAAA 10
  |||||
301 AGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGGCGGCCATGGAGAAAA 350
  .
11 TAGTGCTTCTTTTGGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGC 60
  |||||
351 TAGTGCTTCTTTTGGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGC 400
  .
61 ATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGA 110
  |||||
401 ATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGA 450
  .
111 AAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGAAACACA 160
  |||||
451 AAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGAAACACA 500
  .
161 ACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGAT 210
  |||||
501 ACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGAT 550
  .
211 TGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCAT 260
  |||||
551 TGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCAT 600
  .
261 CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATG 310
  |||||
601 CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATG 650
  .
311 ACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTA 360
  |||||
651 ACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTA 700
  .
361 TTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTC 410
  |||||
701 TTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTC 750
  .
411 TTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACC 460
  |||||
751 TTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACC 800
  .
461 AGGGAAAGTCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC 510
  |||||
801 AGGGAAAGTCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC 850
  .
511 AGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA 560
  |||||

```

ES 2 543 056 T3

```

851 AGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA 900
561 TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGA 610
    |||||||
901 TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGA 950
611 CAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACA 660
    |||||||
951 CAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACA 1000
661 CTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGG 710
    |||||||
1001 CTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGG 1050
711 GCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATG 760
    |||||||
1051 GCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATG 1100
761 CAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATAC 810
    |||||||
1101 CAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATAC 1150
811 AAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA 860
    |||||||
1151 AAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA 1200
861 TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTA 910
    |||||||
1201 TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTA 1250
911 GCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATTGGGGAATGCCCCAAA 960
    |||||||
1251 GCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATTGGGGAATGCCCCAAA 1300
961 TATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCC 1010
    |||||||
1301 TATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCC 1350
1011 TCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAG 1060
    |||||||
1351 TCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAG 1400
1061 GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTAC 1110
    |||||||
1401 GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTAC 1450
1111 CACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCAC 1160
    |||||||
1451 CACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCAC 1500
1161 TCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACA 1210
    |||||||
1501 TCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACA 1550
1211 AAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAA 1260
    |||||||
1551 AAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAA 1600
1261 AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTTAGATGT 1310
    |||||||

```

```

1601 AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGT 1650
      .
1311 CTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTC 1360
      |||
1651 CTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTC 1700
      .
1361 TAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTA 1410
      |||
1701 TAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTA 1750
      .
1411 CAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTA 1460
      |||
1751 CAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTA 1800
      .
1461 TCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAATGGAACGTATG 1510
      |||
1801 TCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAATGGAACGTATG 1850
      .
1511 ACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGT 1560
      |||
1851 ACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGT 1900
      .
1561 GGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATACTGTCAATTTATTC 1610
      |||
1901 GGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATACTGTCAATTTATTC 1950
      .
1611 TACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCT 1660
      |||
1951 TACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCT 2000
      .
1661 TATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA... 1707
      |||
2001 TATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGCG 2050

```

Comparación de genes NA

- 5 El gen NA para el clado 1 del A/Vietnam/1203/04 (H5N1) (SEC ID 39) H5N1naLANL ISDN 38704 x NA_Viet1203_Lark(NVAX) (SEC ID 38)

```

1 .....ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATG 45
      |||
451 CCGGGATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATG 500
      .
46  GTAACTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAAT 95
      |||
501 GTAACTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAAT 550
      .
96  ATGGGTCAGTCATTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAA 145
      |||
551 ATGGGTCAGTCATTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAA 600
      .
146 TCAGCAATACTAATTTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAAATTA 195
      |||
601 TCAGCAATACTAATTTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAAATTA 650
      .
196 GCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCCATTAACGGATGGGCTGTATACAGTAA 245

```

```

|||||
651 GCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAACGGATGGGCTGTATACAGTAA 700
.
.
.
246 GGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAG 295
|||||
701 GGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAG 750
.
.
.
296 AGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGAATGCAGAACTTTCTTTTGGACT 345
|||||
751 AGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGAATGCAGAACTTTCTTTTGGACT 800
.
.
.
346 CAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAG 395
|||||
801 CAGGGAGCCTCGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAG 850
.
.
.
396 AAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCC 445
|||||
851 AAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCC 900
.
.
.
446 CATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCAT 495
|||||
901 CATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCAT 950
.
.
.
496 GATGGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGC 545
|||||
951 GATGGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGC 1000
.
.
.
546 TGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTT 595
|||||
1001 TGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTT 1050
.
.
.
596 GGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAAT 645
|||||
1051 GGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAAT 1100
.
.
.
646 GGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATC 695
|||||
1101 GGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATC 1150
.
.
.
696 ACATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAAGTGGTTAAATCAGTCGAAT 745
|||||
1151 ACATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAAGTGGTTAAATCAGTCGAAT 1200
.
.
.
746 TGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTAATGCC 795
|||||
1201 TGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTAATGCC 1250
.
.
.
796 GGAGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCC 845
|||||
1251 GGAGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCC 1300
.
.
.
846 ATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAAATAGGATATATATGCA 895
|||||
1301 ATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAAATAGGATATATATGCA 1350
.
.
.
896 GTGGAGTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGT 945
|||||
1351 GTGGAGTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGT 1400
.
.
.
946 GGTCCGGTGTCTCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTTCATTTAA 995

```

```

|||||
1401 GGTCCGGTGTCTCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTTCATTTAA 1450
.
996 ATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCCAGGA 1045
|||||
1451 ATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCCAGGA 1500
.
1046 GCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGT 1095
|||||
1501 GCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGT 1550
.
1096 AGCTTTTTCAGTGAAACAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATA 1145
|||||
1551 AGCTTTTTCAGTGAAACAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATA 1600
.
1146 TAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGACTAGATTGCATAA 1195
|||||
1601 TAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGACTAGATTGCATAA 1650
.
1196 GACCTTGTTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCCAAAGAGAGCACÀ 1245
|||||
1651 GACCTTGTTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCCAAAGAGAGCACÀ 1700
.
1246 ATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAAATAGTGACAC 1295
|||||
1701 ATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAAATAGTGACAC 1750
.
1296 TGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCCGAGTTGCCATTACCATTTGACA 1345
|||||
1751 TGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTACCATTTGACA 1800
.
1346 AGTAG..... 1350
|||||
1801 AGTAGGGGCCCTCGAGTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTAC 1850

```

Comparaciones de los genes M1

- 5 El gen para el clado 1 de A/Vietnam/1203/04 (H5N1) (SEC ID 40) H5N1m1Lan1 ISDN39958 x
M1_Viet1203_Lark(NVAX) (SEC ID 41)

```

1 .....ATGAGTCTTCTAACCG 16
|||||
301 ATATCTGCAGAATTGCCCTTAGAATTGACGTCATGAGTCTTCTAACCG 350
.
17 AGGTGCAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCC 66
|||||
351 AGGTGCAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCC 400
.
67 GAGATCGCACAGAACTTGAAGATGTCTTGCAGGAAAGAACACCGATCT 116
|||||
401 GAGATCGCACAGAACTTGAAGATGTCTTGCAGGAAAGAACACCGATCT 450
.
117 CGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGA 166
|||||
451 CGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGA 500
.
167 CTAAGGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGA 216
|||||

```

```

501 CTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGA 550
217 GGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGA 266
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
551 GGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGA 600
267 TCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG 316
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
601 TCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG 650
317 AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTCGCACTCAGCTACTCAACCGGT 366
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
651 AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTCGCACTCAGCTACTCAACCGGT 700
367 GCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGAC 416
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
701 GCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGAC 750
417 TACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAG 466
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
751 TACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAG 800
467 ATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTA 516
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
801 ATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTA 850
517 ATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTAT 566
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
851 ATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTAT 900
567 GGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGATCG 616
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
901 GGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGATCG 950
617 CTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCAT 666
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
951 CTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCAT 1000
667 CCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTTGCAGGC 716
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1001 CCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTTGCAGGC 1050
717 CTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1051 CTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA

```

Todas las secuencias se clonaron y analizaron de acuerdo con los métodos desvelados anteriormente.

5 Ejemplo de referencia 25

Generación de los genes HA, NA y M1 optimizados del clado 1 de A/Vietnam/1203/04 (H5N1) para la expresión eficaz en células Sf9

- 10 Los siguientes polipéptidos se derivaron de los nucleótidos de codón optimizado que corresponden al A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Los nucleótidos se diseñaron y sintetizaron (Geneart GMBH, Regensburg, FRG) como se ha desvelado anteriormente (véase el Ejemplo 24).

VN1203-ha-cs-opt (sitio de escisión modificado, subrayado) (SEC ID 33)

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
AQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPA
NDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKNSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
RNVVWLIKNNAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISVGT
STLNQRLVPKIATRSKVNQNGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVATGLR
NSPQRET----RGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN
ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI
CI*

5 VN1203-ha-spc-opt (péptido de señal modificado, subrayado) (SEC ID 34)

Mplykl1nlvlwlvavsnaip DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
AQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPA
NDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKNSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
RNVVWLIKNNAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISVGT
STLNQRLVPKIATRSKVNQNGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVATGLR
NSPQRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN
ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI
CI*

VN1203-ha-sph9-opt (El péptido de señal y el sitio de señal están sombreados) (SEC ID 35)

10

METISLITIL LVVTASNA DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
AQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPA
NDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKNSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
RNVVWLIKNNAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISVGT
STLNQRLVPKIATRSKVNQNGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVATGLR
NSPQRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN
ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI
CI*

Ejemplo de referencia 26

15 Inmunogenicidad de VLP de H5N1 del Vietnam/1203/2003 (Ahorro de dosis extrema)

Se inmunizaron ratones BALB/c por vía intramuscular e intranasal con VLP de H5N1 a dosis muy bajas de VLP (0,2, 0,04, 0,008, 0,0016 µg de HA/dosis). Los ratones se sangraron los días 0, 21 y 35. Se les puso un refuerzo a los ratones el día 21. El suero se ensayó en cuanto a anticuerpos anti-HA por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando RBC de pavo y virus de gripe utilizando un ELISA. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 24 y 25.

20

Los resultados indican que se observaba una respuesta inmunitaria total robusta cuando se administraban VLP por vía intramuscular a dosis muy bajas. La robustez de la respuesta era similar al control a 3,0 y 0,6 µg de HA/dosis. Estos datos muestran que se apreciaba una respuesta a la dosis verdadera y que la respuesta de anticuerpos a 0,2 µg de VLP es mayor que 3,0 µg de proteína rHA. Aunque la respuesta no era tan robusta en la administración intranasal, una dosis de VLP a 0,2 µg de HA/dosis inducía una respuesta robusta. El título de ELISA con 0,2 µg de dosis en este experimento es similar a la dosis de 0,12 de la vacuna con VLP de H3N2 en los experimentos previos, véase anteriormente.

25

30

Ejemplo de referencia 27**Estudios de exposición**

- 5 Tras la inoculación a ratones BALB/c con VLP a concentraciones de 3 µg, 0,6 µg, 0,12 µg y 0,02 µg de VLP de H3N2 por vía intramuscular e intranasal (dosis de HA total), los ratones se desafiaron con virus de gripe A/Aichi/268x31. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 27 y 28. Estos datos muestran que hay un descenso de peso en todos los animales vacunados, sin embargo, los animales que se vacunaron con 3,0 µg y 0,12 µg de VLP se recuperaban más rápido que los otros animales tanto en las vacunaciones intramuscular como intranasal. Las dosis intranasales proporcionaban una protección mayor.

Ejemplo de referencia 29**Estudios de exposición (hurones)**

- 15 En este estudio, los hurones se vacunaron con VLP de H9N2. Había un total de 18 hurones en el estudio de exposición: 6 vacunados falsamente, 6 vacunados con media dosis (1,5 µg), y 6 vacunados con una dosis alta (15,0 µg) por vía intramuscular. Luego se desafiaron los hurones con 10⁶ EID₅₀ de A/HK/1073/99 por vía intranasal. Los lavados nasales se recolectaron los días 1, 3, 5, y 7. Los virus en los lavados nasales se titularon los días 3, 5, y 7 para todos los animales. Estos datos se representan en la Tabla 2 y la Figura 29. Estos datos muestran que en el día 7, todos los animales vacunados no tenían virus detectables en los lavados nasales mientras que el grupo falso tenía títulos víricos detectables.

TABLA 2. Títulos de virus tipo silvestre (log10/ml) en hurones tras la exposición vírica
Grupo: Placebo control falso (n = 6)

Hurón	Día 3	Día 5	Día 7
4512	7	5,5	3,5
4524	6,5	6,75	1,98
4525	7,5	6,5	6,75
4526	7,5	7,25	3,5
4527	6,75	7,25	2,5
4528	7,5	6,25	2,75
Media	7,125	6,583333	3,496667
Desv. Estánd.	0,44017	0,66458	1,699137

Grupo: Dosis baja

Hurón	Día 3	Día 5	Día 7
3916	6,75	2,75	1,5
3917	7,5	5,5	1,5
3918	7,5	6,5	1,5
3919	5,5	3	1,5
3920	6,75	2,25	1,5
3921	6,5	3,5	1,5
Media	6,75	3,916667	1,5
Desv. Estánd.	0,74162	1,693123	0

30 Grupo: Dosis alta

Hurón	Día 3	Día 5	Día 7
3922	6,5	2,75	1,5
3923	6,25	3,75	1,5
3924	5,75	1,5	1,5
3925	6,5	4,75	1,5
3926	6,25	3,5	1,5

3927	5,75	1,5	1,5
Media	6,166667	2,958333	1,5
Desv. Estánd.	0,341565	1,298236	0

Ejemplo de referencia 30

Estudios de inoculación intramuscular e intranasal en ratones

5 Se inocularon los ratones con VLP A/Fujian/411/2002 (H3N2) a concentraciones de 3 µg, 0,6 µg, 0,12 µg o 0,024 µg (dosis total HA) por vía intramuscular o intranasal el día 0 y se reforzaron 3 semanas más tarde. Los ratones de control se inocularon con A/Wyoming (cepa vacunal similar a Fujian) inactivado con formalina o PBS. Los sueros se recolectaron de los ratones inoculados las semanas 0, 3, 5, y 8. Los sueros recolectados se ensayaron para detectar
10 anticuerpos anti-HA por el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI) y anticuerpos anti-gripe por ELISA. El ensayo se llevó a cabo utilizando cepas de virus de gripe A/Fujian/411/2002, A/Panama/2007/99, A/Wyoming/3/03 y A/New York/55/2004 H3N2. Los resultados de estos estudios se muestran en las Figuras 30A-H. Estos datos indican que las VLP de H3N2 inducen anticuerpos contra las cepas parentales de A/Fujian/411/2002 de virus de gripe y contra otras cepas de H3N2. Estos datos también indican que los títulos en los ratones inoculados por vía intranasal
15 aparecen más tarde que en los ratones inoculados por vía intramuscular. Sin embargo, los antígenos inactivados no parece ser tan inmunogénico después de la inoculación intranasal, ni es ampliamente protector después de la inoculación intranasal.

Ejemplo 31

20 Generación de los genes HA, NA y M1 del clado 2 de gripe H5N1 optimizado para la expresión eficaz en células Sf9

Los siguientes nucleótidos y polipéptidos optimizados que corresponden a HA, NA y M1 del clado 2 de los virus
25 H5N1 A A/Indonesia/5/05, A/Bar headed goose/Qinghai/1A/2005 y A/Anhui/1/2005, fueron diseñados y sintetizados (Geneart GMBH, Regensburg, FRG) como se ha desvelado anteriormente. Los nucleótidos y polipéptidos optimizados se enumeran posteriormente. Con el fin de fabricar VLP, la HA de A/Anhui se pueden expresar con NA y M1 de A/Indonesia. Para las VLP que comprenden HA y NA de A/Qinghai, el gen M1 de A/Indonesia se puede co-expresar con HA y NA de A/Quinhai.

30 A/INDONESIA/5/05

HA optimizada de A/INDONESIA (los codones de inicio y parada están subrayados) (SEC ID 42)

```
GGTACCGGATCCGCCACCATGGAGAAGATCGTGCTGCTGGCTATCGTGTCCTGGTG
AAGTCCGACCAGATCTGCATCGGTTACCAACGCTAACAACCTCCACCGAGCAGGTGGACACC
ATCATGGAGAAGAACGTCACCGTGACCCACGCTCAGGACATCCTCGAAAAGACCCACAAC
GGCAAGCTGTGCGACCTGGACGGTGTCAAGCCCTGATCCTGCGTGACTGCTCCGTGGCT
GGTTGGCTGCTGGGTAAACCCCATGTGCGACGAGTTCATCAACGTGCCCGAGTGGTCTCTAC
ATCGTGGAGAAGGCTAACCCACCAACGACCTGTGCTACCCCGGTTCTTCAACGACTAC
GAGGAGCTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCC
AAGTCCCTCTTGGTCCGACCACGAGGCTTCTCCGGTGTCTCCTCCGCTTGCCCCCTACCTG
GGTCCCCCTCCTTCTTCCGTAAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAATCCACCTACCTG
ACCATCAAGAAGTCCTACAACAACCAACCAAGGAGGACCTGCTGGTCTGTGGGGTATC
CACCACCCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCCGCTCTGTACCAGAACCCACCACTACATC
TCCATCGGCACCTCCACCCTGAACCAAGCGTCTGGTGCCCAAGATCGCTACCCGTTCCAAG
GTGAACGGCCAGTCCGGTCGTATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCTAACGACGCT
ATCAACTTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTACGCTTACAAGATCGTGAAG
AAGGGCGACTCCGCTATCATGAAGTCCGAGCTGGAGTACGGTAACTGCAACACCAAGTGC
CAGACCCCATGGGTGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACC
ATCGGCGAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACCGTCTGGTGCTGGCTACCGGTCTGCGT
```

35

AACTCCCCCAGCGGAGTCCCGTCGTAAGAAGCGTGGTCTGTTTCGGCGCTATCGCTGGT
TTCATCGAGGGCGGTTGGCAGGGCATGGTGGACGGATGGTACGGTTACCACCACTCTAAC
GAGCAGGGTTCCGGTTACGCTGCTGACAAGGAGTCCACCCAGAAGGCTATCGACGGCGTC
ACCAACAAGGTGAACTCCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTGGGTCTGT
GAGTTCAACAACCTCGAGCGTCTGATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTTC
CTGGACGTGTGGACCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGATGGAGAACGAGCGTACCCTG
GACTTCCACGACTCCAACGTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCCTGCAGCTGCGTGAC
AACGCTAAGGAGCTGGGTAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCAGACAACGAGTGC
ATGGAGTCCATCCGTAACGGCACCTACAACCTACCCCAAGTACTCCGAGGAGGCTCGTCTG
AAGCGTGAGGAGATCTCCGGCGTGAAGCTCGAGTCCATCGGAACCTACCAGATCCTGTCC
ATCTACTCCACCGTGGCTTCCTCCCTGGCTCTGGCTATCATGATGGCTGGTCTGTCCCTG
TGGATGTGCTCCAACGGTTCCCTGCAGTGCCGTATCTGCATCTAATGAAAGCTTGAGCTC

Secuencia de proteína HA de A/INDONESIA (SEC ID 43)

5

MEKIVLLLA I VSLVKSQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHPNDA
AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
INSSMPFHNI HPLTIGCEPK YVKSRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQSGY AADKESTQKA IDGVTNKVN
IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWY NAELLVLMEN
ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDNAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
GLSLWMCNSG SLQCRICI

HA optimizada de A/INDONESIA (sitio de escisión eliminado) (los codones de inicio y de parada están subrayados) (SEC ID 44)

10

GGATCCGCCACCATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCTATCGTGCTCCCTGGTGAAGTCC
GACCAGATCTGCATCGGTTACCACGCTAACAACCTCCACCGAGCAGGTGGACACCATCATG
GAGAAGAAGCTCACCCTGACCCACGCTCAGGACATCCTCGAAAAGACCCACAACGGCAAG
CTGTGCGACCTGGACGGTGTCAAGCCCCGTATCCTGCGTGACTGCTCCGTGGCTGGTTGG
CTGCTGGGTAACCCCATGTGCGACGAGTTCATCAACGTGCCCCGAGTGGTCTACATCGTG
GAGAAGGCTAACCCACCAACGACCTGTGCTACCCCGGTTCCCTTCAACGACTACGAGGAG
CTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGTCC
TCTTGGTCCGACCACGAGGCTTCTCCGGTGTCTCTCCGCTTGCCCCCTACCTGGGTTC
CCCTCCTTCTTCCGTAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACTCCACCTACCCACCATC
AAGAAGTCTTACAACAACCAACCAAGGAGGACCTGCTGGTCTGTGGGGTATCCACCAC
CCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCCGTCTGTACCAGAACCCACCACCTACATCTCCATC
GGCACCTCCACCCTGAACCAGCGTCTGGTGCCCAAGATCGCTACCCGTTCCAAGGTGAAC
GGCCAGTCCGGTCTGATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCTAACGACGCTATCAAC
TTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTACGCTTACAAGATCGTGAAGAAGGGC
GACTCCGCTATCATGAAGTCCGAGCTGGAGTACGGTAACCTGCAACACCAAGTGCCAGACC
CCCATGGGTGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACCATCGGC
GAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACCGTCTGGTGCTGGCTACCGGTCTGCGTAACCTC
CCCCAGCGCAGTCCCGTGGTCTGTTCCGGCGCTATCGCTGGTTTCATCGAGGGCGGTTGG
CAGGGCATGGTGGACGGATGGTACGGTTACCACCACTCTAACGAGCAGGGTTCCGGTTAC
GCTGCTGACAAGGAGTCCACCCAGAAGGCTATCGACGGCGTCACCAACAAGGTGAAGTCC
ATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTGGGTCGTGAGTTCAACAACCTCGAG
CGTCGTATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTTCTGGACGTGTGGACCTAC
AACGCCGAGCTGCTGGTGCTGATGGAGAACGAGCGTACCCTGGACTTCCACGACTCCAAC
GTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCCTGCAGCTGCGTGACAACGCTAAGGAGCTGGGT
AACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCAGACAACGAGTGCATGGAGTCCATCCGTAAC
GGCACCTACAACCTACCCCAAGTACTCCGAGGAGGCTCGTCTGAAGCGTGAGGAGATCTCC
GGCGTGAAGCTCGAGTCCATCGGAACCTACCAGATCCTGTCCATCTACTCCACCGTGGCT
TCCTCCCTGGCTCTGGCTATCATGATGGCTGGTCTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGT

TCCCTGCAGTGCCGTATCTGCATCTAATGAAAGCTT

Secuencia de la proteína HA de A/INDONESIA (SEC ID 45)

MEKIVLLAI VSLVKSQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
 CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
 PNDAINFESN GNFIAPYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
 INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKS NRLVLA TGLRNSPQRE SRGLFGAIAG
 FIEGGWQGMV DGWYGYHHSN EQSGYAADK ESTQKAIDGV TNKVNSIIDK
 MNTQFEAVGR EFNNLERRIE NLNKKMEDGF LDVWTYNAEL LVL MENERTL
 DFHDSNVKNL YDKVRLQLRD NAKELGNGCF EFYHKCDNEC MESIRNGTYN
 YPQYSEEARL KREEISGVKL ESIGTYQILS IYSTVASSLA LAIMMAGLSL
 WMCSNGSLQC RIC1

5

NA optimizada de A/INDONESIA (los codones de inicio y de parada están subrayados) (SEC ID 46)

GGTACC^{GG}GATCGCCACCATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCTCCATCTGC
 ATGGTGATCGGTATCGTGTCCCTGATGCTGCAGATCGGTAACATGATCTCCATCTGGGTG
 TCCCACTCCATCCAGACCGGTAACAGCACCAGGCTGAGTCCATCTCCAACACCAACCCC
 CTGACCGAGAAGGCTGTGGCTTCCGTGACCCTGGCTGGTAACCTCCCTGTGCCCCATC
 CGTGGTTGGGCTGTGCACTCCAAGGACAACAACATCCGCATCGGTTCCAAGGGTGACGTG
 TTCGTGATCCGTGAGCCCTTCATCTCCTGCTCCACCTCGAGTGCCGTACCTTCTTCCTG
 ACCCAAGGTGCTCTGCTGAACGACAAGCACTCCAACGGCACCCTGAAGGACCGTTCCTCC
 CACCGTACCTGATGTCTGCCCCGTGGGCGAGGCTCCCTCCCCCTACAACCTCCCGTTTC
 GAGTCCGTGGCTTGGTCCGCTTCCGCTTGCCACGACGGCACCTCTGGCTGACCATCGGT
 ATCTCCGGTCCCGACAACGAGGCTGTGCTGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCAGAC
 ACCATCAAGTCTGGCGTAACAACATCCTGCGTACCCAGGAGTCCGAGTGCGCTTGCCTG
 AACGGTTCTGCTTACCGTGATGACCGACGGTCCCTCCGACGGCCAGGCTTCTTACAAG
 ATCTTCAAGATGGAGAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGGAGCTGGACGCTCCCAACTAC
 CACTACGAGGAGTGCTCTTGCTACCCCGACGCTGGCGAGATCACTGCGTGTGCCGTGAC
 AACTGGCACGGTTCCAACCGTCCCTGGGTGCTCTCAACCAGAACCTCGAGTACCAGATC
 GGTACATCTGCTCCGGCGTGTTCGGTGACAACCCCGTCCCAACGACGGAACCGGTTCC
 TGCGGTCCCATGTCCCCCAACGGTGCTTACGGTGTCAAGGGCTTCTCCTTCAAGTACGGT
 AACGGTGTCTGGATCGGTGCTACCAAGTCCACCAACTCCCGCTCCGGTTTCGAGATGATC
 TGGGACCCCAACGGTTGGACCGGCACCGACTCTTCTTCTCCGTGAAGCAGGACATCGTG
 GCTATCACCGACTGGTCCGGTTACTCCGGTTCCTTCGTGCAGCACCCCGAGCTGACCGGT
 CTGGACTGCATTCGTCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCCGTGGTTCGTCCCAAGGAGTCC
 ACCATCTGGACCTCCGGCTCCTCCATCTCTTCTGCGGTGTGAAGTCCGACACCGTGTCC
 TGGTCTTGCCCGACGGTGCCGAGCTGCCCTTACCATCGACAAGTAATGAAAGCTTGAG
 CTC

10

Secuencia de la proteínas NA de A/INDONESIA (SEC ID 47)

MNPNQKIITI GSICMVGIV SLMLQIGNMI SIWVSHSIQT GNQHQAESIS
 NTNPLEKAV ASVTLAGNSS LCPIRGWAVH SKDNNIRIGS KGDVVFVIREP
 FISCSHLECR TFFLTQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY
 NSRFESVAWS ASACHDGTSW LTIGISGPDN EAVAVLKYN IITDTIKSWR
 NNILRTQESE CACVNGSCFT VMTDGPSDQ ASYKIFKMEK GKVVKSVELD
 APNYHYEES CYPDAGEITC VCRDNWHGSN RPWVSFNQNL EYQIGYICSG
 VFGDNPRPND GTGSCGPMSP NGAYGVKGFS FKYGNVWIG RTKSTNSRSG
 FEMIWDPNGW TGTDSSFSVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTGLDCIRP
 CFWVELIRGR PKESTIWTSG SSISFCGVNS DTVSWSWPDG AELPFTIDK

15

M1 optimizada de A/INDONESIA (SEC ID 48)

GGTACCGGATCCGCCACCATGTCCTGCTGACCGAGGTGGAGACCTACGTGCTGTCCATC
ATCCCTCCGGTCTCTGAAGGCTGAGATCGCTCAGAAGCTCGAGGACGTTTTCGCTGGC
AAGAACACCGACCTCGAGGCTCTGATGGAGTGGCTCAAGACCCGTCCTATCTGTCCCCC
CTGACCAAGGGTATCCTGGGTTTCGTGTTACCCGTGACCGTGCCCTCCGAGCGTGGTCTG
CAGCGTCGTGCTTTTCGTGCAAGACGCTCTGAACGGTAACGGTGACCCCAACAACATGGAC
CGTGCTGTGAAGCTGTACAAGAAGCTGAAGCGGAGATCACCTTCCACGGTGCTAAGGAG
GTGTCCCTGTCTACTCCACCGGTGCTCTGGCTAGCTGCATGGGCCTGATCTACAACCGT
ATGGGCACCGTGACCAACGAGGTGGCCTTCGGTCTGGTCTGCGCTACCTGCGAGCAGATC
GCTGACTCCCAGCACCGTTCCACCGTCAGATGGCTACCATCACCAACCCCTGATCCGT
CACGAGAACCGTATGGTGCTGGCTTCCACCGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCTGGT
TCCTCCGAGCAGGCTGCTGAGGCCATGGAGGTGGCAACAGGCTCGTCAGATGGTGCAG
GCTATGCGTACCATCGGCACCCACCCAACTCCTCCGCTGGTCTGCGTGACAACCTGCTC
GAGAACCTGCAGGCTTACCAGAAGCGTATGGGAGTCCAGATGCAGCGCTTCAAGTAATGA
AAGCTTGAGCTC

5 Secuencia de la proteínas M1 de A/INDONESIA (SEC ID 49)

MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDRAVKLY
KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVCAT
CEQIADSQHR SHRQMATITN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THPNSSAGLR DNLLLENLQAY QKRMGVQMQR
FK

A/Anhui/1/2005

10 HA optimizada de A/Anhui (los codones de inicio y de parada están subrayados) (SEC ID 50)

GGTACCGGATCCCTCGAGATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCTATCGTGTCCTGGTG
AAGTCCGACCAGATCTGCATCGGTTACCACGCTAACAACCTCCACCGAGCAGGTGGACACC
ATCATGGAGAAGAAGCTCACCGTGACCCACGCTCAGGACATCCTGGAAAAGACCCACAAC
GGCAAGCTGTGCGACCTGGACGGTGTCAAGCCCTGATCCTGCGTGACTGCTCCGTGGCT
GGTTGGCTGCTGGGTAACCCCATGTGCGACGAGTTCATCAACGTGCCCCGAGTGGTCTAC
ATCGTGAGAAAGGCTAACCCCGCTAACGACCTGTGCTACCCCGGTAACCTCAACGACTAC
GAGGAGCTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCC
AAGTCCCTCTGGTCCGACCACGAGGCTTCCCTCCGGTGTCTCCTCCGCTTGCCCATACCAG
GGCACCCCATCTTTCTTCCGTAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACAACCTACCC
ACCATCAAGCGTTCCTACAACAACACCAACAGGAGGACCTGCTGATCCTGTGGGGTATC
CACCCTCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCACCACTACATC
TCCGTGGGCACCTCCACCCTGAACCAGCGTCTGGTGCCCAAGATCGCTACCCGTTCCAAG
GTGAACGGCCAGTCCGGTCTGATGGACTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCTAACGACGCT
ATCAACTTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTACGCTTACAAGATCGTGAAG
AAGGGCGACTCCGCTATCGTCAAGTCCGAGGTGGAGTACGGTAACCTGCAACACCAAGTGC
CAGACCCCATCGGTGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACC
ATCGGCGAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACAAGCTGGTGCTGGCTACCGGTCTGCGT
AACTCCCCCTGCGTGAGCGTGGTCTGTTCCGGCGCTATCGCTGGTTTCATCGAGGGCGGT
TGGCAGGGCATGGTGGACGGTGGTACGGTTACCACCACAGCAACGAGCAGGGTTCGGT
TACGCTGCTGACAAGGAGTCCACCCAGAAGGCTATCGACGGCGTCACCAACAAGGTGAAC
TCCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTGGGTGCTGAGTTCAACAACCTG
GAGCGTCGTATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTTCTGGACGTGTGGACC
TACAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGATGGAGAACGAGCGTACCCTGGACTTCCACGACTCT
AACGTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCCTGCAGCTGCGTGACAACGCTAAGGAGCTG
GGTAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCGACAACGAGTGCATGGAGTCCGTGCGT
AACGGCACCTACGACTACCCCACTACTCCGAGGAGGCTCGTCTGAAGCGTGAGGAGATC
TCCGGCGTGAAGCTGGAGTCCATCGGCACCTACCAGATCCTGTCCATCTACTCCACCGTG
GCTTCCCTCCGTGGCTCTGGCTATCATGGTGGCTGGTCTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAAC
GGTTCCTGCAAGTGCCGTATCTGCATCTAATAATGAGGCGCGCCAAGCTTGAGCTC

Secuencia de la proteína HA de A/Anhui (SEC ID 51)

```
MEKIVLLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PANDLCYPGN FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYQGTSPFF RNVVWLIKKN NTYPTIKRSY NNTNQEDLLI LWGIHHSNDA
AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMDFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPPEYAY KIVKKGDSAI VKSEVEYGNC NTKCQTPIGA
INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNNKLVL TGLRNSPLRE RGLFGAIAGF
IEGGWQGMVD GWYGYHHSNE QGSGYAADKE STQKAIDGVT NKVNSIIDKM
NTQFEAVGRE FNNLERRIEN LNKKMEDGFL DVWTYNAELL VLMENERTLD
FHDSNVKNLY DKVRLQLRDN AKELGNGCFE FYHKCDNECM ESVRNGTYDY
PQYSEEARLK REEISGVKLE SIGTYQILSI YSTVASSLAL AIMVAGLSLW
MCSNGLSLQCR ICI
```

5 A/Bar headed goose/Qinghai/1A/2005
HA optimizada de A/Qinghai (los codones de inicio y de parada están subrayados) (SEC ID 52)

```
CGGGCGCGGAGCGGCCGCATGAGAGAAGATCGTGCTGCTGGCTATCGTGTCTCTGGTCAAGTCCGACCAGATCTGCA
TCGGTTACCACGCTAACAACTCCACCGAGCAGGTGGACACCATCATGGAGAAGAAGCTACCGTGACCCACGCTCAGGA
CATCCTCGAAAAGACCCACAACGGCAAGCTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCGTGATCCTGCGTGACTGCTCCGTG
GCTGGTTGGCTGCTGGGTAACCCCATGTGCGACGAGTTCTCAACGTGCCCGAGTGGTCTACATCGTGAGAGAAGATCA
ACCCCGCTAACGACCTGTGCTACCCCGGTAACTTCAACGACTACGAGGAGCTGAAGCACCTGCTGTCCCGTATCAACCA
CTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGTCTCTTGGTCCGACCACGAGGCTTCCTCCGGTGTCTCTCCGCTTGCCCA
TACCAGGGCCGTTCTTCTTCTTCCGCAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACAACGCCTACCCACCATCAAGCGTT
CCTACAACAACCAACCAACGAGGAGACCTGCTGGTCTGTGGGTATCCACCAACCCCAACGACGCTGCCGAGCAGACCCG
TCTGTACAGAACCCCAACCTACATCTCCGTGGGCACCTCTACCCTGAACCAGCGTCTGGTGCCCAAGATCGCTACC
CGTCCAAGGTGAACGGCCAGTCCGGTCTGATGGAGTTCTTCTGGACCATCTGAAGCCTAACGACGCTATCAACTTCG
AGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGAACGCTTACAAGATCGTGAAGAAGGGCGACTCCACCATCATGAAGTCCGA
GCTGGAGTACGGCAACTGCAACACTAAGTGCCAGACCCCATCGGTGCTATCAACTCTCCATGCCCTTCCACAACATC
CACCCCTGACTATCGGCGAGTGCCCCAAGTACGTGAAGTCCAACCGTCTGGTGTGGCTACCGGTCTGCGTAACCTCC
CCAGATCGAGACTCGTGGTCTGTTCGGCGCTATCGCTGGTTTCATCGAGGGCGGTTGGCAGGGCATGGTGGACGGTTG
GTACGGTTACCACTCTAACGAGCAGGGTTCCGGTTACGTGCTGACAAGGAGTCTACCCAGAAGGCTATCGACGGC
GTCACCAACAAGGTGAAGTCCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTTCGAGGCTGTGGGTGCTGAGTTCAACAACCTCG
AACGTCGTATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGTTTCTGGACGTGTGGACCTACAACGCCGAGCTGCTGGT
GCTGATGGAGAACGAGCGTACCCTGGACTTCCACGACTCCAACGTGAAGAACCTGTACGACAAGGTCCGCTGCAGCTG
CGTGACAACGCTAAGGAGCTGGGTAACGGTTGCTTCGAGTTCTACCACCGTTGCGACAACGAGTGCATGGAGTCCGTGC
GTAACGGCACCTACGACTACCCCAAGTACCGAGGAGCTCGTCTGAAGCGTGAGGAGATCTCCGGTGTCAAGCTCGA
ATCCATCGGAACCTACCAGATCCTGTCCATCTACTCCACCGTGGCTTCCTCCCTGGCTCTGGCTATCATGGTGGTGGT
CTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGTTCCTGCGAGTGCCGTATCTGCATCTAATAATGAGGCGCGCCAAGCTTGTCGA
```

10 Secuencia de la proteína HA de A /Qinghai (SEC ID 53)

```
MEKIVLLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
PANDLCYPGN FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
CPYQGRSSFF RNVVWLIKKN NAYPTIKRSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
AEQTRLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
PNDAINFESN GNFIAPENAY KIVKKGDSTI MKSELEYGNC NTKCQTPIGA
INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNNKLVL TGLRNSPQIE TRGLFGAIAG
FIEGGWQGMV DGWYGYHHSN EQGSGYAADK ESTQKAIDGV TNKVNSIIDK
MNTQFEAVGR EFNNLERRIE NLNKKMEDGF LDVWTYNAEL LVL MENERTL
DFHDSNVKNL YDKVRLQLRD NAKELGNGCF EFYHRCNEC MESVRNGTYD
YPQYSEEARL KREEISGVKL ESIGTYQILS IYSTVASSLA LAIMVAGLSL
WMCSNGLSLQC RIC I
```

NA optimizada de A/Qinghai (los codones de inicio y de parada están subrayados) (SEC ID 54)

ACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCCCTCGAGATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCTCCATCTGCATGGT
GATCGGTATCGTGTCCCTGATGCTGCAGATCGGTAACATGATCTCCATCTGGGTGTCCCACTCCATCCAGACCGGTAAC
CAGCGTCAGGCCGAGCCCATCTCCAACACCAAGTTCTCACCAGAGAAGGCTGTGGCTTCCGTGACCGTGGCTGGTAACT
CCTCCCTGTGCCCCATCTCCGGTTGGGCTGTGTACTCCAAGGACAACATCCATCCGTATCGGTTCCCGTGGTGACGTGTT
CGTGATCCGTGAGCCCTTCATCTCCTGCTCCCACTCGAATGCCGTACCTTCTTCCGTGACCCAGGGTGCTCTGTGAAC
GACAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGTTCCCCCACCCTACCGTATGTCCTGCCCGTGGGCGAGGCTCCCT
CCCCCTACAACCTCCCGTTTCGAGTCCGTGGCTTGGTCCGCTTCCGCTTGCCACGACGGCACCTCTTGGCTGACCATCGG
TATCTCCGGTCCCGACAACGGTGCTGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCACACCATCAAGTCTGGCGT
AACAACATCCTGCGTACCCAAGAGTCCGAGTGCCTTGGCTGAACGGTTCTGCTTACCGTGTGACCGACGGTCCCT
CCAACGGCCAGGCTTCTACAAGATCTTCAAGATGGAGAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGGAGCTGGACGCTCCCAA
CTACCACTACGAGGAGTCTTGTGCTACCCGACGCTGGCGAGATCACCTGCGTGTGCCGTGACAACCTGGCACGGTTCC
AACCCTCCCTGGGTGTCTTCAACCAGAACCTCGAATACCAGATCGGTTACATCTGCTCCGGCGTGTTCGGTGACAACC
CCCGTCCCAACGACGGAACCGGTTCTGCGGTCCCGTGTCCCCAACGGTGCTTACGGTGTCAAGGGCTTCTCCTTCAA
GTACGGTAACGGTGCTGAGTCCGTCGTACCAAGTCCACCAACTCCCGCTCCGGTTTCGAGATGATCTGGGACCCCAAC
GGTTGGACCGGCACCGACTCTTCTTCTCCGTGAAGCAGGACATCGTGGCTATCACCAGTGGTCCGGTTACTCCGGTT
CCTTCGTGCAGCACCCGAGCTGACCGGTTCTGACTGTATCCGTCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCCGTGGTCCGTCC
CAAGGAGTCCACCATCTGGACCTCCGGCTCCTCCATCTCTTCTGCGGTGTGAACCTCCGACACCGTGTCTGCTCCTGG
CCCGACGGTGCCGAGCTGCCCTTACCATCGACAAGTAATAATGAATCGATTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAAT

5 Secuencia de proteína NA A/Qinghai (SEC ID 55)

MNPNQKIITI GSICMVIGIV SLMLQIGNMI SIWVSHSIQT GNQRQAEPI
NTKFLTEKAV ASVTLAGNSS LCPISGWAVY SKDNSIRIGS RGDVFVIREP
FISCSHLECR TFFLTQGALL NDKHSNGTVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY
NSRFESVAWS ASACHDGTSW LTIGISGPDN GAVAVLKYN IITDTIKSWR
NNILRTQESE CACVNGSCFT VMTDGPSNGQ ASYKIFKMEK GKVVKSVELD
APNYHYEES CYPDAGEITC VCRDNWHGSN RPWVSFNQNL EYQIGYICSG
VFGDNPRPND GTGSCGPVSP NGAYGVKGF FKYGNVWIG RTKSTNSRSG
FEMIWDPNGW TGTDSFSVK QDIVAITDWS GYSGSFVQHP ELTGLDCIRP
CFWVELIRGR PKESTIWTSG SSISFCGVNS DTVSWSWPDG AELPFTIDK

Se proporcionan las siguientes referencias:

- 10 Berglund, P., Fleeton, M. N., Smerdou, C., and Liljestrom, P. (1999). Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497-507.
- 15 Cox, J. C., and Coulter, A. R.(1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248-256.
- 20 Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., and Perdue, M. L. (1999). Baculovirusderived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17, 2265-2274.
- 25 Crowther R A, Kiselev N A, Bottcher B, Berriman J A, Borisova G P, Ose V, Pumpens P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 17, 943-50.
- 30 Goinez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., and Portela, A. (1999). Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1635-1645.
- 35 Johansson, B. E. (1999). Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine* 17, 2073-2080.
- 40 Lakey, D. L., Treanor, J. J., Betts, B. F., Smith, G. E., Thompson, J., Sannella, E., Reed, G., Wilkinson, B. E., and Wright, P. E. (1996) Recombinant baculovirus influenza A hemagglutinin vaccines are well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 174, 838-841.
- Latham, T., and Galarza, J. M. (2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles followingsimultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* 75, 6154-6165.
- Mena, I., Vivo, A., Perez, E., and Portela, A (1996). Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.* 70, 5016-5024.

Murphy, B. R., and Webster, R. G. (1996). Orthomyxoviruses. In "Virology" (D. M. K. B. N. Fields, P. M. Howley, Eds.) Vol. 1, pp. 1397-1445. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Neumann, G., Watanabe, T., and Kawaoka, Y. (2000). Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J. Virol.* 74, 547-551.

Olsen, C. W., McGregor, M. W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B. R., Nelson, K. M., Lunn, D. P., Macklin, M. D., and Swain, W. F. (1997). Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 15, 1149-1156.

Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., and Shortridge, K. F. (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southwestern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75, 9679-9686.

Pumpens, P., and Grens, E. (2003). Artificial genes for chimeric virus-like particles. In: "Artificial DNA" (Khudyakov, Y. E, and Fields, H. A., Eds.) pp. 249-327. CRC Press, New York.

Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R. E., and Smith, J. F. (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239, 389-401.

Slepishkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A., and Cox, N. J. (1995). Protection of mice against influenza A virus challenged by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* 13, 1399-1402.

Treanor, J. J., Betts, R. F., Smith, G. E., Anderson, E. L., Hackett, C. S., Wilkinson, B. E., Belshe, R. B., and Powers, D. C. (1996). Evaluation of a recombinant hemagglutinin expressed in insect cells as an influenza vaccine in Young and elderly adults. *J. Infect. Dis.* 173, 1467-1470.

Tsuji, M., et al. (1998). Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.* 72, 6907-6910.

Ulmer, J. B., et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.

Ulmer, J. B., et al. (1998). Protective CD4+ and CD8+T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.* 72, 5648-5653.

Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2002) Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* 76, 767-773.

Zhou, X., et al. (1995). Generation of cytotoxic and humoral immune responses by non-replicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3009-3013.

Otras realizaciones

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de aclarar utilizando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención que se describen en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novavax, Inc.

<120> Partículas funcionales similares al virus de la gripe (VPL)

<130> RXT/FP6537419

<140> 06826264.1

<141> 18-10-2006

<150> PCT/US2006/040862

<151> 18-10-2006

<150> US 60/727.513

<151> 18-10-2005

<150> US 60/780.847
<151> 10-03-2006

5 <150> US 60/800.006
<151> 15-05-2006

<150> US 60/831.196
<151> 17-07-2006

10 <150> US 60/832.116
<151> 21-07-20061

<150> US 60/845.495
<151> 19-06-2006

15 <160> 58

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 1404
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

25 <400> 1

atgaatccaa atcaaaagat aatagcactt ggctctgttt ctataactat tgcgacaata 60

tgtttactca tgcagattgc catcttagca acgactatga cactacattt caatgaatgt 120

accaaccat cgaacaatca agcagtgcc tgtgaaccaa tcataataga aaggaacata 180

acagagatag tgcatttgaa taatactacc atagagaagg aaagttgtcc taaagtagca 240

gaatacaaga attggtcaaa accgcaatgt caaattacag ggctcgcccc tttctccaag 300

gacaactcaa ttaggctttc tgcaggcggg gatatttggg tgacaagaga accttatgta 360

togtgcggtc ttggtaaatg ttaccaattt gcacttgggc agggaaccac tttgaacaac 420

aaacactcaa atggcacaat acatgatagg agtccccata gaaccctttt aatgaacgag 480

ttgggtgttc catttcattt gggaaaccaa caagtgtgca tagcatggtc cagctcaagc 540

tgccatgatg ggaaggcatg gttacatgtt tgtgtcactg gggatgatag aaatgcgact 600

gctagcatca tttatgatgg gatgcttacc gacagtattg gttcatggtc taagaacatc 660
ctcagaactc aggagtcaga atgcgtttgc atcaatggaa cttgtacagt agtaatgact 720
gatggaagtg catcaggaag ggctgatact aaaatactat tcattagaga agggaaaatt 780
gtccacattg gtccactgtc aggaagtgtc cagcatgtgg aggaatgtc ctgttaccct 840
cggatatccag aagttagatg tgtttgcaga gacaattgga agggctccaa tagaccctg 900
ctatatataa atgtggcaga ttatagtgtt gattctagtt atgtgtgtc aggacttgtt 960
ggcgacacac caagaaatga cgatagctcc agcagcagta actgcaggga tctaataac 1020
gagagagggg gccaggagt gaaaggggtg gcctttgaca atggaaatga tgtttggatg 1080
ggacgaacaa tcaagaaaga ttgcgctct ggttatgaga ctttcagggt cgttgggtgt 1140
tggtactcgg ctaattccaa gtcacaaata aataggcaag tcatagttga cagtataac 1200
tggtctgggt attctgggt attctctgtt gaaggaaaaa cctgcatcaa cagggtgttt 1260
tatgtggagt tgataagagg gagaccacag gagaccagag tatggtggac ttcaaatagc 1320
atcattgtat tttgtggaac ttcagggtacc tatggaacag gctcatggcc cgatggagcg 1380
aatatcaatt tcatgtctat ataa 1404

<210> 2
<211> 1683
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

<400> 2

atggaaacaa taccactaat aactatacta ctagtagtaa cagcaagcaa tgcagataaa 60
atctgcatcg gccaccagtc aacaaactcc acagaaactg tggacacgct aacagaaacc 120
aatgttcctg tgacacatgc caaagaattg ctccacacag agcataatgg aatgctgtgt 180
gcaacaagcc tgggacatcc cctcattcta gacacatgca ctattgaagg actagtctat 240
ggcaaccctt cttgtgacct gctgttggga ggaagagaat ggtcctacat cgtcgaaaga 300
tcatcagctg taaatggaac gtgttaccct gggaatgtag aaaacctaga ggaactcagg 360
acacttttta gttccgctag ttctaccaa agaatccaaa tcttcccaga cacaacctgg 420
aatgtgactt acactggaac aagcagagca tgttcagggt cattctacag gagtatgaga 480
tggtgactc aaaagagcgg tttttaccct gttcaagacg cccaatacac aaataacagg 540
ggaaagagca ttcttttctg gtggggcata catcaccac ccacctatac cgagcaaaca 600
aatttgtaca taagaaacga cacaacaaca agcgtgacaa cagaagattt gaataggacc 660
ttcaaaccag tgatagggcc aaggccctt gtcaatggtc tgcagggaag aattgattat 720
tattggtcgg tactaaaacc aggcacaaaca ttgcgagtac gatccaatgg gaatctaatt 780

gctccatggg atggacacgt tctttcagga gggagccatg gaagaatcct gaagactgat 840
 ttaaaagggtg gtaattgtgt agtgcaatgt cagactgaaa aagggtggctt aaacagtaca 900
 ttgccattcc acaatatcag taaatatgca tttggaacct gccccaaata tgtaagagtt 960
 aatagtctca aactggcagt cggctctgagg aacgtgcctg ctagatcaag tagaggacta 1020
 tttggagcca tagctggatt catagaagga ggttggccag gactagtgcg tggctgggtat 1080
 ggtttccagc attcaaata tcaaggggtt ggtatggctg cagatagga ttcaactcaa 1140
 aaggcaattg ataaaataac atccaagggtg aataatatag tgcacaagat gaacaagcaa 1200
 tatgaaataa ttgatcatga attcagttag gttgaaacta gactcaatat gatcaataat 1260
 aagattgatg accaaatata agacgtatgg gcatataatg cagaattgct agtactactt 1320
 gaaaatcaaa aaacactcga tgagcatgat gcgaacgtga acaatctata taacaagggtg 1380
 aagagggcac tgggctccaa tgctatggaa gatgggaaag gctgtttcga gctataccat 1440
 aaatgtgatg atcagtgc atgaaacaatt cgggaacggga cctataatag gagaaagtat 1500
 agagaggaat caagactaga aaggcagaaa atagaggggg ttaagctgga atctgagggg 1560
 acttacaaaa tctcaccat ttattcgact gtgcctcat ctcttgctgct tgcaatgggg 1620
 tttgtgctt tctgtttctg ggccatgtcc aatggatctt gcagatgcaa catttgtata 1680
 taa 1683

<210> 3
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 3

atgagtcttc taaccgaggt cgaacgtac gttctctcta tcatcccatc agggcccttc 60
 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaggat gtttttgtag ggaagaacac agatcttgag 120
 gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta 180
 gggtttggtg tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgatttgct 240
 caaatgccc taaatgggaa tggagaccca aacaacatgg acagggcagt taaactatac 300
 aagaagctga agagggaaat gacattccat ggagcaaagg aagttgcact cagttactca 360
 actggtgcgc ttgccagttg catgggtctc atatacaacc ggatgggaac agtgaccaca 420
 gaagtggctc ttggcctagt atgtgccact tgtgaacaga ttgctgatgc ccaacatcgg 480
 tcccacaggc agatggcgac taccaccaac ccactaatca ggcatgagaa cagaatggta 540
 ctagccagca ctacggctaa ggccatggag cagatggctg gatcaagtga gcaggcagca 600
 gaagccatgg aagtcgcaag tcaggctagg caaatgggtc aggctatgag gacaattggg 660

actcacccta gttccagtgc aggtctaaaa gatgatctta ttgaaaattt gcaggcttac 720
cagaaacgga tgggagtgca aatgcagaga ttcaagtga 759

5 <210> 4
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <400> 4
 aacggtccga tggagaaaat agtgcttctt c 31

15 <210> 5
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

20 <400> 5
 aaagctttta aatgcaaatt ctgcattgta acg 33

25 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

30 <400> 6
 aacggtccga tgaatccaaa tcagaagata at 32

35 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

40 <400> 7
 aaagcttcta ctgtcaatg gtgaatggca ac 32

45 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

50 <400> 8
 aacggtccga tgagtcttct aaccgaggtc 30

55 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 9
 aaagctttca ctggaatcgc tgcattcgca c 31

<210> 10
 <211> 1707
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 10

```

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc      60
attgggttacc atgcaaacaa ttcaacagag cagggttgaca caatcatgga aaagaacggt      120
actgttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta      180
gatggagtga agcctctaata ttttaagagat tgtagttag ctggatggct cctcgggaac      240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat      300
ccaaccaatg acctctgtta cccagggagt ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta      360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt caaatcatcc ccaaagttc ttgggtccgat      420
catgaagcct catcaggagt gagctcagca tgtccatacc tgggaagtcc ctcccttttt      480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaaaagctac      540
aataatacca accaagaaga tcttttggtta ctgtggggaa ttcaccatcc taatgatgcy      600
gcagagcaga caaggctata tcaaaaccca accacctata tttccattgg gacatcaaca      660
ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacyg gcaaagtgga      720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa cctaattgat caatcaactt cgagagtaat      780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctgagcaatt      840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatgggggcy      900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa      960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca acagggctca gaaatagccc tcaaagagag     1020
agcagaagaa aaaagagagg actatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg     1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac     1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactca     1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgga gggaaattta taacttagaa     1260
aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt ttctagatgt ctggacttat     1320
aatgccgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat     1380
gttaagaacc tctacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt     1440
aacggttggt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tataagaaac     1500
ggaacgtaca actatccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaaagaga ggaaataagt     1560
ggggtaaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttattc aacagtggcy     1620
agttccctag cactggcaat catgatggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga     1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa                                     1707

```

<210> 11
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 11

atgaatccaa atcagaagat aataaccatt ggatcaatct gtatggtaat tggaatagtt	60
agcttaatgt tacaaattgg gaacatgac tcaatatggg tcagtcattc aattcagaca	120
gggaatcaac accaagctga atcaatcagc aatactaacc ctcttactga gaaagctgtg	180
gcttcagtaa cattagcggg caattcatct ctttgcccca ttagaggatg ggctgtacac	240
agtaaggaca acaatataag gatcgggtcc aagggggatg tgtttggtat tagagagccg	300
ttcatctcat gctccacct ggaatgcaga actttcttct tgactcaggg agccttgctg	360
aatgacaagc actccaacgg gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt	420
tgtcctgtgg gtgaggctcc ctctccatat aactcaagggt ttgagtcctgt tgcttggtca	480
gcaagtgcct gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg gaatttcttg cccagacaat	540
gaggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg	600
aacaacatac tgagaactca agagtcctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact	660
gtaatgactg atggaccaag tgatgggcag gcatcatata agatcttcaa aatggaaaaa	720
ggaaaagtgg tcaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc	780
tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtttgccaggg ataattggca tggctcaaat	840
aggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga	900
gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta gttgtggccc gatgtccct	960
aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatgggtg ttggatcggg	1020
agaaccaaaa gcactaatc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg	1080
actggaacgg acagtagctt ttcagtgaac caagatatag tagcaataac tgattggtca	1140
ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gattagattg cataagacct	1200
tgtttctggg ttgagttaat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg	1260
agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtga gttgggtcttg gccagacggg	1320
gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag	1350

<210> 12

<211> 759

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 12

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcatcccgtc agggcccttc 60
aaagccgaga tcgcgcagaa acttgaagat gtctttgcag gaaagaacac cgatctcgag 120
gctctcatgg agtggetgaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattttg 180
ggatttgtat tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
cagaatgccc taaatggaaa tggagatcca aataatatgg atagggcagt taagctatat 300
aagaagctga aaagagaaat aacattccat ggggctaaag aggtttcact cagctactca 360
accggtgcac ttgccagttg catgggtctc atatacaaca ggatgggaac ggtgactacg 420
gaagtggctt ttggcctagt gtgtgccact tgtgagcaga ttgcagattc acagcatcgg 480
tctcacaggc agatggcaac tatcaccaac ccactaatca ggcataaaaa cagaatggtg 540
ctggccagca ctacagctaa ggctatggag cagatggcgg gatcaagtga gcaggcagcg 600
gaagccatgg aggtcgctaa tcaggctagg cagatggtgc aggcaatgag gacaattgga 660
actcatccta actctagtgc tggctctgaga gataatcttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaaacgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtga 759

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 13

aggatccatg aagactatca ttgcttgag 30

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 14

aggtaacctca aatgcaaatg ttgcacctaa tg 32

<210> 15

<211> 72

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 15

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt agaaggagat agaaccatga atccaaatca 60

aaagataata ac 72

<210> 16

<211> 57

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 16

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctatataggc atgagattga tgtccgc 57

<210> 17

<211> 38

<212> ADN

	<213> Virus de la gripe	
5	<400> 17 aaagaattca tgagtcttct aaccgaggtc gaaacgta	38
	<210> 18 <211> 38 <212> ADN <213> Virus de la gripe	
10	<400> 18 aaattcgaat tactccagct ctatgctgac aaaatgac	38
15	<210> 19 <211> 57 <212> ADN <213> Virus de la gripe	
20	<400> 19 agaatcatga gtcttctaac cgaggctgaa acgcctatca gaaacgaatg ggggtgc	57
25	<210> 20 <211> 38 <212> ADN <213> Virus de la gripe	
30	<400> 20 aaattcgaat tactccagct ctatgctgac aaaatgac	38
	<210> 21 <211> 30 <212> ADN «213> Virus de la gripe	
35	<400> 21 agaattcatg gcgtccaag gcaccaaacg	30
40	<210> 22 <211> 50 <212> ADN <213> Virus de la gripe	
45	<400> 22 agcggccgct taattgtcgt actcctctgc attgtctccg aagaataaag	50
50	<210> 23 <211> 35 <212> ADN <213> Virus de la gripe	
	<400> 23 agaattcatg aaggcaataa ttgtactact catgg	35
55	<210> 24 <211> 47 <212> ADN <213> Virus de la gripe	
60	<400> 24 agcggccgct tatagacaga tggagcaaga aacattgtct ctggaga	47
65	<210> 25 <211> 31 <212> ADN <213> Virus de la gripe	

ES 2 543 056 T3

<400> 25
 agaattcatg ctaccttcaa ctatacaaac g 31

5 <210> 26
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <400> 26
 agcggccgct tacagagcca tatcaacacc tgtgacagtg 40

15 <210> 27
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Vac2-hac-opt

<400> 27

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 Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn			
100	105		110
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu			
115	120		125
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser			
130	135		140
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe			
145	150	155	160
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile			
165	170		175
Lys Lys 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 Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg			
210	215		220
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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 Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540
 Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 28
 <211> 572
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Vac2-hac-spc-opt

10

<400> 28

```

Met  Pro  Leu  Tyr  Lys  Leu  Leu  Asn  Val  Leu  Trp  Leu  Val  Ala  Val  Ser
1      5      10      15

Asn  Ala  Ile  Pro  Asp  Gln  Ile  Cys  Ile  Gly  Tyr  His  Ala  Asn  Asn  Ser
      20      25      30

Thr  Glu  Gln  Val  Asp  Thr  Ile  Met  Glu  Lys  Asn  Val  Thr  Val  Thr  His
      35      40      45

Ala  Gln  Asp  Ile  Leu  Glu  Lys  Thr  His  Asn  Gly  Lys  Leu  Cys  Asp  Leu
      50      55      60

Asp  Gly  Val  Lys  Pro  Leu  Ile  Leu  Arg  Asp  Cys  Ser  Val  Ala  Gly  Trp
65      70      75      80

Leu  Leu  Gly  Asn  Pro  Met  Cys  Asp  Glu  Phe  Ile  Asn  Val  Pro  Glu  Trp
      85      90      95

Ser  Tyr  Ile  Val  Glu  Lys  Ala  Asn  Pro  Thr  Asn  Asp  Leu  Cys  Tyr  Pro
      100     105     110

Gly  Ser  Phe  Asn  Asp  Tyr  Glu  Glu  Leu  Lys  His  Leu  Leu  Ser  Arg  Ile
      115     120     125

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

His  Glu  Ala  Ser  Ser  Gly  Val  Ser  Ser  Ala  Cys  Pro  Tyr  Leu  Gly  Ser
145      150     155     160

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

Tyr  Pro  Thr  Ile  Lys  Lys  Ser  Tyr  Asn  Asn  Thr  Asn  Gln  Glu  Asp  Leu
      180     185     190

```

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

Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
435 440 445

Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala
465 470 475 480

Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn
485 490 495

Glu Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr
500 505 510

Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu
515 520 525

Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala
530 535 540

Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met
545 550 555 560

Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565 570

<210> 29
<211> 570
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Vac2-hac-sph9-opt

<400> 29

Met Glu Thr Ile Ser Leu Ile Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Ser
1 5 10 15

Asn Ala Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln
35 40 45

Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly
50 55 60

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

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

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

Asn Ser Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly
 340 345 350

Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly
 355 360 365

Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala
 370 375 380

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

Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg
 405 410 415

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

Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val
 435 440 445

Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys
 450 455 460

Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu
 465 470 475 480

Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys
 485 490 495

Met Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu
 500 505 510

Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser
 515 520 525

Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser
 530 535 540

Leu Ala Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser
 545 550 555 560

Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565 570

<210> 30
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Vac2-hac-cs-opt

<400> 30

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 Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

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

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

Lys Lys 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 Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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 Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser 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> 31

<211> 449

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Vac2-naj-opt

<400> 31

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala Glu Ser
35 40 45

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

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

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

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

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 32
<211> 252
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Vac2-mc-opt

<400> 32

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
100 105 110

Lys Glu Val Ser Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Asn Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Asn
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
245 250

<210> 33
<211> 564
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> VN1203-ha-CS-opt

<400> 33

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly
 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
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 370 375 380
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 385 390 395 400
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

<210> 34

<211> 572

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> VN1203-ha-spc-opt

<400> 34

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1 5 10 15

Asn Ala Ile Pro Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser
20 25 30

Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His
35 40 45

Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu
50 55 60

Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp
65 70 75 80

Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp
85 90 95

Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro
 100 105 110

Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile
 115 120 125

Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser
 130 135 140

His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala
 165 170 175

Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu
 180 185 190

Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr
 195 200 205

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

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

Gly Gln Asn Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn
 245 250 255

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

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

Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala
 290 295 300

Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly
 305 310 315 320

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

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

<210> 35
 <211> 570
 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> VN1203-ha-sph9-opt

5

<400> 35

Met Glu Thr Ile Ser Leu Ile Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Ser
1 5 10 15

Asn Ala Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln
35 40 45

Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly
50 55 60

Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu
65 70 75 80

Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr
85 90 95

Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
100 105 110

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His
115 120 125

Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser His Glu
130 135 140

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

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

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

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

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

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

<210> 36
 <211> 1707
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 36

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc	60
attgggttacc atgcaaacaa ctgcacagag cagggttgaca caataatgga aaagaacggt	120
actgtttacac atgcccaga catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcgatcta	180
gatggagtga agcctctaatt tttgagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcggaaac	240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat	300
ccagtcaatg acctctgtta ccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta	360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaagttc ttggtccagt	420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctcccttttc	480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac	540
aataatacca accaagaaga tcttttggtta ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcg	600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca	660
ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga	720

aggatggagt tcttctggac aatttttaaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
 ggaaattttca ttgctccaga atatgcatac aaaatttgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggag 900
 ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa 960
 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgag actgggctca gaaatagccc tcaaagagag 1020
 agaagaagaa aaaagagagg attattttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
 cagggaaatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
 atcattgaca aaatgaacac tcagtgtgag gccgttgga ggggaatttaa caacttagaa 1260
 aggagaatag agaattttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat 1320
 aatgctgaac ttctgggtct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
 gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
 aacggttggt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaat 1500
 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcgagac taaaaagaga ggaaataagt 1560
 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg 1620
 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatgga 1680
 tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 37

<211> 1750

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 37

agtgtgatgg atatctgcag aattcgccct taggcgcgcc atggagaaaa tagtgcttct 60
 ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc attggttacc atgcaaacaa 120
 ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt actgttacac atgccccaga 180
 catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcgatcta gatggagtga agcctctaata 240
 tttgagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcggaac ccaatgtgtg acgaattcat 300
 caatgtgccg gaatggctct acatagtgga gaaggccaat ccagtcaatg acctctgtta 360
 cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta ttgagcagaa taaaccattt 420
 tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttgggtccagt catgaagcct cattaggggt 480
 gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctcttttttc agaaatgtgg tatggcttat 540
 caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac aataatacca accaagaaga 600

tcttttggta ctgtggggga ttcacccatcc taatgatgcy gcagagcaga caaagctcta 660
tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca ctaaaccaga gattgggtacc 720
aagaatagct actagatcca aagtaaacyg gcaaagtggg aggatggagt tcttctggac 780
aattttaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat ggaaatttca ttgctccaga 840
atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt atgaaaagtg aattggaata 900
tggtaaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcy ataaactcta gcatgccatt 960
ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa tatgtgaaat caaacagatt 1020
agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag agaagaagaa aaaagagagg 1080
attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg cagggaatgg tagatggttg 1140
gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac gctgcagaca aagaatccac 1200
tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg atcattgaca aatgaacac 1260
tcagtttgag gccgttggaa ggaatttaa caacttagaa aggagaatag agaatttaaa 1320
caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat aatgctgaac ttctggttct 1380
catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat gtcaagaacc ttacgacaa 1440
ggtcgcacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt aacggttggt tgcagttcta 1500
tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaat ggaacgtatg actaccgca 1560
gtattcagaa gaagcgagac taaaagaga ggaaataagt ggagtaaat tggaatcaat 1620
aggaatttac caaatactgt caatttatc tacagtggcg agttccctag cactggcaat 1680
catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg tcggtacaat gcagaatttg 1740
catttaagcg 1750

<210> 38
<211> 1350
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

<400> 38

atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatagtt 60
agcttaatgt tacaatttgg gaacatgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca 120
gggaatcaac accaatctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg 180
gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaacggatg ggctgtatac 240
agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aagggggatg tgtttgttat aagagagccg 300
ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg 360
aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc ctacagaaac attaataagt 420

tgtcctgtgg gtgaggctcc ctecccatat aactcaaggt ttgagtcctgt tgcttggtca 480
 gcaagtgtctt gccatgatgg caccagttgg ttgacgattg gaatttctgg ccagacaat 540
 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg 600
 aacaacatac tgagaactca agagtcctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact 660
 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa 720
 gggaaagtgg ttaaactcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc 780
 tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat 840
 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtggg 900
 gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta gttgtggctc ggtgtcctct 960
 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatgggtg ctggatcggg 1020
 agaacaaaaa gcactaatc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg 1080
 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaag caagatatcg tagcaataac tgatttgtca 1140
 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct 1200
 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg ccaaagaga gcacaatttg gactagtggg 1260
 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggctctg gccagacggg 1320
 gccgagttgc cattcaccat tgacaagtag 1350

<210> 39

<211> 1400

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 39

ccgggatgaa tccaaatcag aagataataa ccatcggatc aatctgtatg gtaactggaa 60
 tagttagctt aatgttacia attgggaaca tgatctcaat atgggtcagt cattcaattc 120
 acacagggaa tcaacaccaa tctgaaccaa tcagcaatac taattttctt actgagaaag 180
 ctgtggcttc agtaaaatta gcgggcaatt catctctttg cccattaac ggatgggctg 240
 tatacagtaa ggacaacagt ataaggatcg gttccaaggg ggatgtgttt gttataagag 300
 agccgttcac ctcagtctcc cacttggaat gcagaacttt ctttttgact caggagacct 360
 cgctgaatga caagcactcc aatgggactg tcaaagacag aagccctcac agaacattaa 420
 tgagttgtcc tgtgggtgag gctccctccc catataactc aaggtttgag tctgttgctt 480
 ggtcagcaag tgcttgccat gatggcacca gttgggtgac gattggaatt tctggcccag 540
 acaatggggc tgtggctgta ttgaaataca atggcataat aacagacact atcaagagtt 600
 ggaggaacaa catactgaga actcaagagt ctgaatgtgc atgtgtaaat ggctcttgct 660

5

10

ttactgtaat gactgacgga ccaagtaatg gtcaggcatc acataagatc ttcaaaatgg 720
 aaaaagggaa agtgggttaa tcagtcgaat tggatgctcc taattatcac tatgaggaat 780
 gctcctgtta tcctaattgcc ggagaaatca catgtgtgtg cagggataat tggcatggct 840
 caaatcggcc atgggtatct ttcaatcaaa atttggagta tcaaatagga tatatatgca 900
 gtggagtttt cggagacaat ccacgcccc aatgatggaac aggtagttgt ggtccggtgt 960
 cctctaacgg ggcatatggg gtaaaagggt ttccatttaa atacggcaat ggtgtctgga 1020
 tcggggagaac caaaagcact aattccagga gcggctttga aatgatttgg gatccaaatg 1080
 ggtggactga aacggacagt agcttttcag tgaacaaga tatcgtagca ataactgatt 1140
 ggtcaggata tagcgggagt tttgtccagc atccagaact gacaggacta gattgcataa 1200
 gaccttgttt ctgggttgag ttgatcagag ggcgcccaa agagagcaca atttggacta 1260
 gtggggagcag catatctttt tgtggtgtaa atagtgcac tgtgggttgg tcttggccag 1320
 acggtgctga gttgccattc accattgaca agtaggggccc ctcgagtaag ggcgaattcc 1380
 agcacactgg cggccgttac 1400

<210> 40
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 40

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcatcccgtc agggccccc 60
 aaagccgaga tcgcacagaa acttgaagat gtctttgcag gaaagaacac cgatctcgag 120
 gctctcatgg agtggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattttg 180
 ggatttgtat tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
 cagaatgccc taaatggaaa tggagatcca aataatatgg atagggcagt taagctatat 300
 aagaagctga aaagagaaat aacattccat ggggctaagg aggtcgcact cagctactca 360
 accggtgcac ttgccagttg catgggtctc atatacaaca ggatgggaac ggtgactacg 420
 gaagtggctt ttggcctagt gtgtgccact tgtgagcaga ttgcagattc acagcatcgg 480
 tctcacagac agatggcaac tatcaccaac ccactaatca gacatgagaa cagaatgggtg 540
 ctggccagca ctacagctaa ggctatggag cagatggcgg gatcaagtga gcaggcagcg 600
 gaagccatgg agatcgctaa tcaggctagg cagatgggtgc aggcaatgag gacaattggg 660
 actcactcta actctagtgc tggctctgaga gataatcttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
 cagaaacgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtga 759

<210> 41
 <211> 793
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 41

```

atatctgcag aattcgccct tagaattcga cgtcatgagt cttctaaccg aggtcgaaac      60
gtacgtttctc tctatcatcc cgtcaggccc cctcaaagcc gagatcgcac agaaacttga      120
agatgtcttt gcaggaaaga acaccgatct cgaggctctc atggagtggc taaagacaag      180
accaatcctg tcacctctga ctaaagggat tttgggattt gtattcacgc tcaccgtgcc      240
cagtgcgcga ggactgcagc gtagacgctt tgtccagaat gccctaaatg gaaatggaga      300
tccaaataat atggataggg cagttaagct atataagaag ctgaaaagag aaataacatt      360
ccatggggct aaggaggtcg cactcagcta ctcaaccggg gcacttgcca gttgcatggg      420
tctcatatac aacaggatgg gaacggtgac tacggaagtg gcttttggcc tagtgtgtgc      480
cacttggtgag cagattgcag attcacagca tcggtctcac agacagatgg caactatcac      540
caaccacta atcagacatg agaacagaat ggtgctggcc agcactacag ctaaggctat      600
ggagcagatg ggggatcaa gtgagcaggc agcggaagcc atggagatcg ctaatcaggc      660
taggcagatg gtgcaggcaa tgaggacaat tgggactcat cctaactcta gtgctggtct      720
gagagataat cttcttgaaa atttgcaggc ctaccagaaa cgaatgggag tgcagatgca      780
gcgattcaag tga
                                                                                   793

```

5 <210> 42
 <211> 1740
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Gen HA de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto

<400> 42

```

ggtagcggat ccgccaccat ggagaagatc gtgctgctgc tggctatcgt gtccctgggtg      60
aagtcgacc agatctgcat cggttaccac gctaacaact ccaccgagca ggtggacacc      120
atcatggaga agaacgtcac cgtgaccac gctcaggaca tctcgaaaa gaccacaac      180
ggcaagctgt gcgacctgga cgggtgcaag cccctgatcc tgcgtgactg ctccgtggct      240
ggttggctgc tgggtaaccc catgtgcgac gagttcatca acgtgcccga gtggtcctac      300
atcgtggaga aggctaaccc caccaacgac ctgtgctacc ccggttcctt caacgactac      360
gaggagctga agcacctgct gtcccgatc aaccacttcg agaagatcca gatcatcccc      420
aagtcctctt ggtccgacca cgaggcttcc tccgggtgtct cctccgcttg cccctacctg      480
ggttccccct ccttcttccg taacgtgggtg tggctgatca agaagaactc cacctacccc      540

```

15

accatcaaga agtcctacaa caacaccaac caggaggacc tgctggctcct gtgggggtatc 600
caccacccca acgacgctgc cgagcagacc cgtctgtacc agaaccaccac cacctacatc 660
tccatcggca cctccaccct gaaccagcgt ctgggtgcca agatcgctac ccggtccaag 720
gtgaacggcc agtcgggtcg tatggagttc ttctggacca tcttgaagcc taacgacgct 780
atcaacttcg agtccaacgg caacttcatc gctcccgagt acgcttacaa gatcgtgaag 840
aagggcgact cgcctatcat gaagtccgag ctggagtagc gtaactgcaa caccaagtgc 900
cagaccccca tgggtgctat caactcctcc atgcccttcc acaacatcca cccctgacc 960
atcggcgagt gcccgaagta cgtgaagtcc aaccgtctgg tgctggctac cggctctcgt 1020
aactccccc agcgcgagtc cgcctgtaag aagcgtggtc tgttcggcgc tatcgctggc 1080
ttcatcgagg gcggttgcca gggcatgggt gacggatggc acggttacca ccactctaac 1140
gagcagggtt cgggttacgc tgctgacaag gagtccaccc agaaggctat cgacggcgtc 1200
accaacaagg tgaactccat catcgacaag atgaacaccc agttcgaggc tgtgggtcgt 1260
gagttcaaca acctcgagcg tcgtatcgag aacctgaaca agaagatgga ggacgggttc 1320
ctggacgtgt ggacctacaa cgccgagctg ctgggtgctga tggagaacga gcgtaccctg 1380
gacttccacg actccaacgt gaagaacctg tacgacaagg tccgcctgca gctgcgtgac 1440
aacgctaagg agctgggtaa cggttgcttc gagttctacc acaagtgcga caacgagtgc 1500
atggagtcca tccgtaacgg cacctacaac taccocagc actccgagga ggctcgtctg 1560
aagcgtgagg agatctccgg cgtgaagtc gagtccatcg gaacctacca gatcctgtcc 1620
atctactcca cgtgggttc ctccctggct ctggctatca tgatggctgg tctgtccctg 1680
tggatgtgct ccaacgggtc cctgcagtgc cgtatctgca tctaataaaa gcttgagctc 1740

<210> 43
<211> 568
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 43

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 Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

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

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

Lys Lys 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 Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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	Ser	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile
			340					345					350		
Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr
		355					360					365			
Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys
	370					375					380				
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser
385					390					395					400
Ile	Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe
				405					410					415	
Asn	Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp
			420					425					430		
Gly	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met
		435					440					445			
Glu	Asn	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu
	450					455					460				
Tyr	Asp	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly
465					470				475						480
Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu
				485					490					495	
Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala
			500					505					510		
Arg	Leu	Lys	Arg	Glu	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Ile	Gly
		515					520					525			
Thr	Tyr	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala
	530					535					540				

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 44

<211> 1716

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen HA de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto

<400> 44

```

ggatccgccca ccatggagaa gatcgtgctg ctgctggcta tctgtgccct ggtgaagtcc      60
gaccagatct gcatcggtta ccacgctaac aactccaccg agcaggtgga caccatcatg      120
gagaagaacg tcaccgtgac ccacgctcag gacatcctcg aaaagaccca caacggcaag      180
ctgtgcgacc tggacgggtg caagccccctg atcctgcgtg actgctccgt ggctgggttg      240
ctgctgggta accccatgtg cgacgagttc atcaacgtgc ccgagtggtc ctacatcgtg      300
gagaaggcta accccaccaa cgacctgtgc taccctcggtt ccttcaacga ctacgaggag      360
ctgaagcacc tgctgtcccg tatcaaccac ttcgagaaga tccagatcat cccaagtcc      420
tcttgggtccg accacgaggc ttctctcggt gtctctcccg cttgccccta cctgggttcc      480
ccctccttct tccgtaacgt ggtgtggctg atcaagaaga actccaccta cccaccatc      540
aagaagtctt acaacaacac caaccaggag gacctgctgg tctgtgggg tatccaccac      600
cccaacgacg ctgccgagca gacctgtctg taccagaacc ccaccaccta catctccatc      660
ggcacctcca cctgaacca gcgtctgggtg cccaagatcg ctaccggttc caaggtgaac      720
ggccagtccg gtcgtatgga gttcttcttg accatcctga agcctaacga cgctatcaac      780
ttcgagtcca acggcaactt catcgtctcc gagtacgctt acaagatcgt gaagaagggc      840
gactccgcta tcatgaagtc cgagctggag tacggtaact gcaacaccaa gtgccagacc      900
cccatgggtg ctatcaactc ctccatgccc ttccacaaca tccacccctt gaccatcggc      960
gagtgcacca agtacgtgaa gtccaaccgt ctggtgctgg ctaccggtct gcgtaactcc     1020
ccccagcgcg agtcccggtg tctgttcggc gctatcgctg gtttcatcga gggcggttg      1080
cagggcatgg tggacggatg gtacggttac caccactcta acgagcaggg ttccgggttac     1140
gctgctgaca aggagtccac ccagaaggct atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaactcc     1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gctgtgggtc gtgagttcaa caacctcgag     1260

```

cgctcgatcgc agaacctgaa caagaagatg gaggacgggtt tccctggacgt gtggacctac 1320
 aacgccgagc tgctgggtgct gatggagaac gagcgtaccc tggacttcca cgactccaac 1380
 gtgaagaacc tgtacgacaa ggtccgcctg cagctgcgtg acaacgctaa ggagctgggt 1440
 aacggttgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggagtc catccgtaac 1500
 ggcacctaca actacccccca gtactccgag gaggtcgtc tgaagcgtga ggagatctcc 1560
 ggcgtgaagc tcgagtccat cggaacctac cagatcctgt ccatctactc caccgtgggt 1620
 tcttccttgg ctctggctat catgatggct ggtctgtccc tgtggatgtg ctccaacggc 1680
 tccctgcagt gccgtatctg catctaataa aagctt 1716

<210> 45
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<400> 45

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 Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

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

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

Lys Lys 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 Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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 Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

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

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

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys

[illegible]

<210> 46
<211> 1383
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Gen NA de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto
<400> 46

ggtaccgggat ccgccaccat gaaccccaac cagaagatca tcaccatcgg ctccatctgc 60
atggtgatcg gtatcgtgtc cctgatcctg cagatcggta acatgatctc catctgggtg 120

tcccactcca tccagaccgg taaccagcac caggctgagt ccactctcaa caccaacccc 180
 ctgaccgaga aggctgtggc ttccgtgacc ctggctggta actcctccct gtgccccatc 240
 cgtgggttggg ctgtgcactc caaggacaac aacatccgca tcggttccaa gggtgacgtg 300
 ttccgtgatcc gtgagccctt catctcctgc tcccacctcg agtgccgtac cttcttctctg 360
 acccaagggtg ctctgctgaa cgacaagcac tccaacggca ccgtgaagga ccgttcccc 420
 caccgtaccc tgatgtcctg ccccggtggg gaggctccct cccctacaa ctcctgttcc 480
 gagtccgtgg cttgggtccg ttccgcttgc cagcagggca cctcttggct gaccatcggc 540
 atctccgggtc ccgacaacga ggctgtcgtc gtgctgaagt acaacggcat catcaccgac 600
 accatcaagt cctggcgtaa caacatcctg cgtaccagg agtccgagt cgcttgctgtg 660
 aacggttcct gcttcaccgt gatgaccgac ggctccctccg acggccaggc ttctacaag 720
 atcttcaaga tggagaaggg caagggtgtg aagtccgtgg agctggacgc tcccaactac 780
 cactacgagg agtgtctctg ctaccccgac gctggcgaga tcacctgctg gtgcccgtgac 840
 aactggcacg gttccaaccg tccctgggtg tccttcaacc agaacctcga gtaccagatc 900
 gggtacatct gctccggcgt gttcgggtgac aacccccgtc ccaacgacgg aaccggttcc 960
 tgccgtccca tgtccccaa cgggtgcttac ggtgtcaagg gcttctcctt caagtacggc 1020
 aacgggtgtc ggatcggctg taccaagtcc accaactccc gctccgggtt cgagatgatc 1080
 tgggacccca acggttggac cggcaccgac tcttcttctt ccgtgaagca ggacatcgtg 1140
 gctatcaccg actgggtccg ttactccggt tccttcgtgc agcacccca gctgaccggt 1200
 ctggactgca ttcgtccctg cttctgggtg gagctgatcc gtggctgtcc caaggagtcc 1260
 accatctgga cctccggctc ctccatctct ttctgcggtg tgaactccga caccgtgtcc 1320
 tggctcctggc ccgacgggtg cgagctgccc ttcaccatcg acaagtaatg aaagcttgag 1380
 etc 1383

<210> 47
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<400> 47

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
 20 25 30

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala Glu Ser

ES 2 543 056 T3

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

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

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

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

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 48

<211> 792

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen M1 de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto

<400> 48

ggtagcggat ccgccaccat gtcctgctg accgaggtgg agacctacgt gctgtccatc 60
atccccctccg gtctcttgaa ggctgagatc gctcagaagc tcgaggacgt tttcgctggc 120
aagaacaccg acctcgaggc tctgatggag tggctcaaga cccgtcccat cctgtccccc 180

ctgaccaagg gtatcctggg tttcgtgttc accctgaccg tgcctccga gcgtgggtctg 240
cagcgtcgtc gtttcgtgca gaacgctctg aacggtaacg gtgaccccaa caacatggac 300
cgtgctgtga agctgtacaa gaagctgaag cgcgagatca ccttccacgg tgctaaggag 360
gtgtccctgt cctactccac cgggtgctctg gctagctgca tgggcctgat ctacaaccgt 420
atgggcaccg tgaccaccga ggtggccttc ggtctgggtc gcgctacctg cgagcagatc 480
gctgactccc agcacggttc ccaccgtcag atggctacca tcaccaaccc cctgatecgt 540
cacgagaacc gtatgggtgt ggcttccacc accgctaagg ctatggagca gatggctggt 600
tcttccgagc aggctgctga ggccatggag gtggccaacc aggctcgtca gatgggtgcag 660
gctatgcgta ccacggcac ccaccccaac tcttccgtg gtctgcgtga caacctgctc 720
gagaacctgc aggcttacca gaagcgtatg ggagtccaga tgcagcgctt caagtaatga 780
aagcttgagc tc 792

<210> 49
<211> 252
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 49

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
100 105 110

Lys Glu Val Ser Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Asn Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Asn
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
245 250

<210> 50

<211> 1736

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen HA de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto

<400> 50

ggtagcggat ccctcgagat ggagaagatc gtgctgctgc tggctatcgt gtccctgggtg 60
aagtccgacc agatctgcat cggttaccac gctaacaact ccaccgagca ggtggacacc 120
atcatggaga agaacgtcac cgtgaccac gctcaggaca tcttggaata gaccacacac 180
ggcaagctgt gcgacctgga cgggtgtcaag cccctgatcc tgcgtgactg ctccgtgggt 240
ggttggctgc tgggtaaccc catgtgcgac gagttcatca acgtgcccga gtggtcctac 300
atcgtggaga aggctaaccc cgctaacgac ctgtgctacc ccggttaactt caacgactac 360
gaggagctga agcacctgct gtcccgtatc aaccacttcg agaagatcca gatcatcccc 420
aagtcctctt ggtccgacca cgaggcttcc tccggtgtct cctccgcttg cccataaccag 480
ggcaccatct ctttcttccg taacgtgggtg tggctgatca agaagaacaa cacctacccc 540

```

accatcaagc gttcctacaa caacaccaac caggaggacc tgctgatcct gtgggggtatc 600
caccactcca acgacgctgc cgagcagacc aagctgtacc agaaccacac cacctacatc 660
tccgtgggca cctccaccct gaaccagcgt ctgggtgccca agatcgctac ccgttccaag 720
gtgaacggcc agtccggctg tatggacttc ttctggacca tcctgaagcc taacgacgct 780
atcaacttcg agtccaacgg caacttcacg gctcccagat acgcttataa gatcgtgaag 840
aagggcgact ccgctatcgt caagtccgag gtggagtacg gtaactgcaa caccaagtgc 900
cagaccccca tcggtgctat caactcctcc atgcccttcc acaacatcca ccccctgacc 960
atcggcgagt gcccgaagta cgtgaagtcc aacaagctgg tgctggctac cggctctgct 1020
aactcccccc tgcgtgagcg tggctctgtc gccgctatcg ctggtttcat cgagggcggt 1080
tggcagggca tgggtggacgg ttggtacggt taccaccaca gcaacgagca gggttccggt 1140
tacgctgctg acaaggagtc caccagaag gctatcgacg gcgtcaccaa caaggtgaac 1200
tccatcatcg acaagatgaa caccagttc gaggtctgtg gtcgtgagtt caacaacctg 1260
gagcgtcgta tcgagaacct gaacaagaag atggaggacg gtttcctgga cgtgtggacc 1320
tacaacgccg agctgctggt gctgatggag aacgagcgta ccctggactt ccacgactct 1380
aacgtgaaga acctgtacga caaggtccgc ctgcagctgc gtgacaacgc taaggagctg 1440
ggtaacgggt gcttcgagtt ctaccacaag tgcgacaacg agtgcattga gtccgtgctg 1500
aacggcacct acgactacc ccagtactcc gagggagctc gtctgaagcg tgaggagatc 1560
tccggcgtga agctggagtc catcggcacc taccagatcc tgtccatcta ctccaccgtg 1620
gcttctctcc tggctctggc tatcatggtg gctggtctgt ccctgtggat gtgctccaac 1680
ggttccttgc agtgccgtat ctgcatctaa taatgaggcg cgccaagctt gagctc 1736

```

<210> 51
 <211> 563
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<400> 51

```

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 Phe Asn
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140
 Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Asp 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 Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile 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 Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser				
	325		330	335
Pro Leu Arg Glu Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu				
	340		345	350
Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser				
	355		360	365
Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys				
	370		375	380
Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met				
385		390		395 400
Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg				
	405		410	415
Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val				
	420		425	430
Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr				
	435		440	445
Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg				
	450		455	460
Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu				
465		470		475 480
Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly				
	485		490	495
Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu				
	500		505	510
Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile Leu				
	515		520	525
Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Val				
	530		535	540

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

Ile Cys Ile

<210> 52

<211> 1738

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen HA de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto

<400> 52

```

cgggcgcgga ggggccgcat ggagaagatc gtgctgctgc tggtatcgt gtctctggtc      60
aagtccgacc agatctgcat cggttaccac gctaacaact ccaccgagca ggtggacacc      120
atcatggaga agaacgtcac cgtgaccac gctcaggaca tcttcgaaaa gaccacaaac      180
ggcaagctgt gcgacctgga cggcgtgaag cccctgatcc tgcgtgactg ctccgtggct      240
ggttggctgc tgggtaaccc catgtgcgac gagttcctca acgtgcccga gtggctctac      300
atcgtggaga agatcaaccc cgctaacgac ctgtgctacc ccggttaactt caacgactac      360
gaggagctga agcacctgct gtcccgtatc aaccacttcg agaagatcca gatcatcccc      420
aagtctcttt ggtccgacca cgaggcttcc tccggtgtct cctccgcttg cccataccag      480
ggcgttcttt ccttcttccg caacgtgggtg tggctgatca agaagaacaa cgcctacccc      540
accatcaage gttcctacaa caacaccaac caggaggacc tgctggctct gtgggggtatc      600
caccacccca acgacgctgc cgagcagacc cgtctgtacc agaacccac cacctacatc      660
tccgtgggca cctctaccct gaaccagcgt ctggtgcccga agatcgctac ccgttccaag      720
gtgaacggcc agtccggctg tatggagttc ttctggacca tctgaagcc taacgacgct      780
atcaacttcg agtccaacgg caacttcac gctcccgaga acgcttaca gatcgtgaag      840
aagggcgact ccacatcat gaagtccgag ctggagtacg gcaactgcaa cactaagtgc      900
cagaccccca tcggtgctat caactcctcc atgcccttcc acaacatcca cccctgact      960
atcggcgagt gcccgaagta cgtgaagtcc aaccgtctgg tgctggctac cggctctgct      1020
aactcccccc agatcgagac tcgtggtctg ttccggcgcta tcgctgggtt catcgagggc      1080
ggttggcagg gcatggtgga cggttggtac ggttaccacc actctaacga gcaggggttc      1140
ggttacgctg ctgacaagga gtctaccag aaggctatcg acggcgctac caacaagggtg      1200
aactccatca tcgacaagat gaacaccag ttcgaggctg tgggtcgtga gttcaacaac      1260

```

ctcgaacgtc gtatcgagaa cctgaacaag aagatggagg acggtttcct ggacgtgtgg 1320
 acctacaacg ccgagctgct ggtgctgatg gagaacgagc gtaccctgga cttccacgac 1380
 tccaacgtga agaacctgta cgacaaggtc cgctgcagc tgcgtgacaa cgctaaggag 1440
 ctgggtaacg gttgcttcga gttctaccac cgttgcgaca acgagtgcac ggagtcctgtg 1500
 cgtaacggca cctacgacta cccccagtac tccgaggagg ctggtctgaa gcgtgaggag 1560
 atctccgggtg tcaagctcga atccatcgga acctaccaga tctgtccat ctactccacc 1620
 gtggtttcct ccttggtctt ggctatcatg gtggtctggtc tgtccctgtg gatgtgtctc 1680
 aacggttccc tgcagtgcgc tatctgcac taataatgag gcgcgccaag cttgtcga 1738

<210> 53

<211> 564

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

<400> 53

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 Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ile Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Arg Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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 Asn Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile 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 Ile Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 370 375 380
 Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys

[illegible]

<210> 54

$\langle 211 \rangle$ 1422

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Gen NA de la gripe optimizado para la expresión en sistemas de expresión de células de insecto

<400> 54

accgtccac catcgggcgc ggatccctcg agatgaaccc caaccagaag atcatcacca 60

tcggctccat ctgcatggtg atcggtatcg tgtccctgat gctgcagatc ggtaacatga 120

```

tctccatctg ggtgtccac tccatccaga ccggtaacca gcgtcaggcc gagcccatct 180
ccaacaccaa gttcctcacc gagaaggctg tggcttccgt gaccctggct ggtaactcct 240
ccctgtgccc catctccggt tgggctgtgt actccaagga caactccatc cgtatcggtt 300
cccgtgggtga cgtgttcgtg atccgtgagc ccttcattctc ctgctccac ctogaatgcc 360
gtaccttctt cctgaccag ggtgctctgc tgaacgacaa gcactccaac ggcaccgtga 420
aggaccgttc cccccaccgt accctgatgt cctgccccgt gggcgagget ccctcccct 480
acaactcccg ttctgagtc gtggcttggc ccgcttccgc ttgccacgac ggcacctctt 540
ggctgaccat cgttatctcc ggtcccgaca acggtgctgt ggctgtgctg aagtacaacg 600
gcatcatcac cgacaccatc aagtcctggc gtaacaacat cctgcgtacc caagagtccg 660
agtgcgcttg cgtgaacggt tcttgcttca ccgtgatgac cgacgggtccc tccaacggcc 720
aggcttctta caagatcttc aagatggaga agggcaaggc ggtgaagtcc gtggagctgg 780
acgctcccaa ctaccactac gaggagtgtc cttgctaccc cgacgctggc gagatcacct 840
gcgtgtgccc tgacaactgg cacggttcca accgtccctg ggtgtccttc aaccagaacc 900
tcgaatacca gatcgggttac atctgctccg gcgtgttcgg tgacaacccc cgtcccaacg 960
acggaaccgg ttcttgcggt cccgtgtccc ccaacgggtc ttacgggtgc aagggttct 1020
ccttcaagta cggtaacggt gtctggatcg gtcgtaccaa gtccaccaac tcccgtccg 1080
gtttcgagat gatctgggac cccaacgggt ggaccggcac cgactcttcc ttctccgtga 1140
agcaggacat cgtggctatc accgactggc ccggttactc cggttccttc gtgcagcacc 1200
ccgagctgac cggctctggac tgtatccgtc cctgcttctg ggtggagctg atccgtggtc 1260
gtcccaagga gtccaccatc tggacctccg gctctccat ctctttctgc ggtgtgaact 1320
ccgacaccgt gtcctgggtc tggcccgacg gtgcccagct gcccttcacc atcgacaagt 1380
aataatgaat cgatttgtcg agaagtacta gaggatcata at 1422

```

<210> 55

<211> 449

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

<400> 55

```

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
1           5           10           15

```

```

Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile
20           25           30

```

```

Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln Arg Gln Ala Glu Pro

```

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

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

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

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

Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly Phe Glu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 56

<211> 1750

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 56

attcgccctt aacgggtccga tggagaaaat agtgcttctt cttgcaatag tcagtcttgt 60

taaaagtgat cagatttgca ttggttacca tgcaaacaaat tcaacagagc aggttgacac 120

aatcatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgcccaagac atactggaaa agacacacaa 180

cggggaagctc tgcgatctag atggagttaa gcctctaatt ttaagagatt gtagtgtagc 240

tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc aatgtaccgg aatgggtctta 300

```

catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac ccaggaggtt tcaacgacta 360
tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt gagaaaattc aaatcatccc 420
caaaagtctt tgggccgatc atgaagcctc atcaggagtg agctcagcat gtccatacct 480
gggaagtccc tcctttttta gaaatgtggt atggcttata aaaaagaaca gtacataccc 540
aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaagat cttttggtac tgtggggaat 600
tcaccatcct aatgatgcgg cagagcagac aaggctatat caaaacccaa ccacctatat 660
ttccattggg acatcaacac taaaccagag attggtacca aaaatagcta ctagatccaa 720
agtaaacggg caaagtggaa ggatggaggt cttctggaca attttaaaac ctaatgatgc 780
aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcac tgctccagaa tatgcataca aaattgtcaa 840
gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat ggtaactgca acaccaagtg 900
tcaaaactca atggggggcg taaactctag tatgccattc cacaacatac accctctcac 960
catcggggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta gtccctgcaa caggggtcag 1020
aaatagccct caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga ctatttggag ctatagcagg 1080
ttttatagag ggaggatggc agggaatggt agatggttg tatgggtacc accatagcaa 1140
tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact caaaaggcaa tggatggagt 1200
caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact cagtttgagg ccgttggaag 1260
ggaatttaat aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac aagaagatgg aagacgggtt 1320
tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctggttctc atggaaaatg agagaactct 1380
agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag gtccgactac agcttaggga 1440
taatgcaaag gagctgggta acggttggtt cgagttctat cacaatgtg ataatgaatg 1500
tatggaaagt ataagaaacg gaacgtgcaa ctatccgcag tattcagaag aagcaagatt 1560
aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata ggaacttacc aaatactgtc 1620
aatttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc atgatggctg gtctatcttt 1680
atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc atttaaaagc tttaagggcg 1740
aattccagca 1750

```

<210> 57
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

 <400:> 57

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 Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

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

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

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

Lys Lys 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 Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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 Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

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

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Met Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

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

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445

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

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480

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

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Cys Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 58

<211> 568

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

<400> 58

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 Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

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

5

10

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Lys 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 Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln 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 Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380

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

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

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

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

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

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

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

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

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

REIVINDICACIONES

1. Una partícula similar a un virus (VLP) que comprende una proteína M1 del virus de la gripe, una proteína hemaglutinina (HA) de la gripe y una proteína neuraminidasa (NA) de la gripe, en que la secuencia de aminoácidos de dicha proteína M1 es idéntica al menos en el 98 % a la SEC ID N° 49 y en donde la VLP se expresa en una célula de insecto.
2. La VLP de la reivindicación 1, en la que dicha proteína M1 comprende la SEC ID N° 49.
3. La VLP de la reivindicación 1, en la que dicha HA y NA son H5 y N1, respectivamente.
4. La VLP de la reivindicación 3, en la que dicha H5 o N1 son de un clado 1 del virus de la gripe H5N1, o en la que dichas H5 y N1 son de un clado 2 del virus de la gripe H5N1.
5. La VLP de la reivindicación 4, en la que a) dichas proteínas H5 y N1 comprenden las SEC ID N°s 53 y 55, respectivamente, o una secuencia que comprende al menos una identidad de secuencia del 90 % con dichas secuencias, o b) dichas proteínas H5 y N1 comprenden las SEC ID N°s 43 y 47, respectivamente, o una secuencia que comprende una identidad de secuencia de al menos el 90 % con dichas secuencias.
6. La VLP de la reivindicación 3, en la que dichas H5 y N1 son de un virus de la gripe que se ha aislado de un animal infectado.
7. La VLP de la reivindicación 6, en la que dicho animal infectado es un ser humano.
8. La VLP de la reivindicación 1, en la que dicha célula de insecto es Sf9.
9. La VLP de la reivindicación 1, en la que dicha VLP provoca anticuerpos neutralizantes en un ser humano o un animal que son protectores contra la infección de gripe cuando se administra a dichos ser humano o animal.
10. Una composición inmunogénica que comprende una dosis eficaz de una VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha composición comprende un adyuvante.
12. Una vacuna que comprende una dosis eficaz de una VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
13. La vacuna de la reivindicación 12, en la que dicha vacuna comprende al menos dos VLP diferentes con diferentes proteínas de la gripe.
14. La vacuna de las reivindicaciones 12 o 13, en la que dicha vacuna comprende un adyuvante.
15. Una vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que dicha vacuna se ha tratado para inactivar baculovirus.
16. La vacuna de la reivindicación 15, en la que dicho tratamiento de inactivación comprende la incubación de una muestra que comprende VLP en aproximadamente un 0,2 % de β -propil lactona (BPL) durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 25 °C.
17. La composición inmunogénica o la vacuna de las reivindicaciones 11 o 14 en que la dicho adyuvante comprende Novasomes®.
18. El uso de una VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la preparación de una vacuna para un animal, en donde la vacuna induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe en dicho animal.
19. Una vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-17 para su uso en un método de tratamiento en donde la vacuna induce inmunidad sustancial contra la infección por el virus de la gripe en un animal.
20. La vacuna para el uso de la reivindicación 19 o el uso de la reivindicación 18, en donde la vacuna se administra al animal por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea.
21. Un método de elaboración de una VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende la expresión de una proteína M1, una proteína hemaglutinina (HA) de la gripe y una proteína neuraminidasa (NA) de la gripe en una célula de insecto en donde la secuencia de aminoácidos de dicha proteína M1 es idéntica al menos en un 98 % a la SEC ID N° 49.

22. El método de la reivindicación 21, en el que dicha célula de insecto es Sf9.

ATGAATCCAAATCAAAAGATAATAGCACTTGGCTCTGTTTCTATAACTATTGCGACAATATG
TTTACTCATGCAGATTGCCATCTTAGCAACGACTATGACACTACATTTCAATGAATGTACCA
ACCCATCGAACAATCAAGCAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAGGAACATAACAGAG
ATAGTGCATTTGAATAATACTACCATAGAGAAGGAAAGTTGTCCTAAAGTAGCAGAATACAA
GAATTGGTCAAAACCGCAATGTCAAATTACAGGGTTTCGCCCCCTTCTCCAAGGACAACCTCAA
TTAGGCTTTCTGCAGGCGGGGATATTTGGGTGACAAGAGAACCTTATGTATCGTGCGGTCTT
GGTAAATGTTACCAATTTGCACTTGGGCAGGGAACCACTTTGAACAACAAACACTCAAATGG
CACAATACATGATAGGAGTCCCCATAGAACCCTTTTAATGAACGAGTTGGGTGTTCCATTTT
ATTTGGGAACCAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAAGCTGCCATGATGGGAAGGCA
TGGTTACATGTTTGTGTCCTGTTGATGATACAAATGCGACTGCTAGCATCATTATGATGG
GATGCTTACCCACAGTATTGGTTCATGCTCTAAGAACATCCTCAGAACTCAGGAGTCAGAAT
GCGTTTGCATCAATGGAACCTGTACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAAGGGCT
GATACTAAAATACTATTTCATTAGAGAAGGGAAAATTGTCCACATTGGTCCACTGTCAGGAAG
TGCTCAGCATGTGGAGGAATGCTCCTGTTACCCCCGGTATCCAGAAGTTAGATGTGTTTGCA
GAGACAATTGGAAGGGCTCCAATAGACCCGTGCTATATATAAATGTGGCAGATTATAGTGTT
GATTCTAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTTGGCGACACACCAAGAAATGACGATAGCTCCAG
CAGCAGTAACTGCAGGGATCCTAATAACGAGAGAGGGGGGCCAGGAGTGAAAGGGTGGGCCT
TTGACAATGGAAATGATGTTTGGATGGGACGAACAATCAAGAAAGATTTCGCGCTCTGGTTAT
GAGACTTTTCAGGGTCGTTGGTGGTTGGACTACGGCTAATTCCAAGTCACAAATAAATAGGCA
AGTCATAGTTGACAGTGATAACTGGTCTGGGTATTCTGGTATATTCTCTGTTGAAGGAAAAA
CCTGCATCAACAGGTGTTTTTATGTGGAGTTGATAAGAGGGAGACCACAGGAGACCAGAGTA
TGGTGGACTTCAAAATAGCATCATTGTATTTTGTGGAACCTTCAGGTACCTATGGAACAGGCTC
ATGGCCCGATGGAGCGAATATCAATTTTCATGTCTATATAA

FIGURA 1

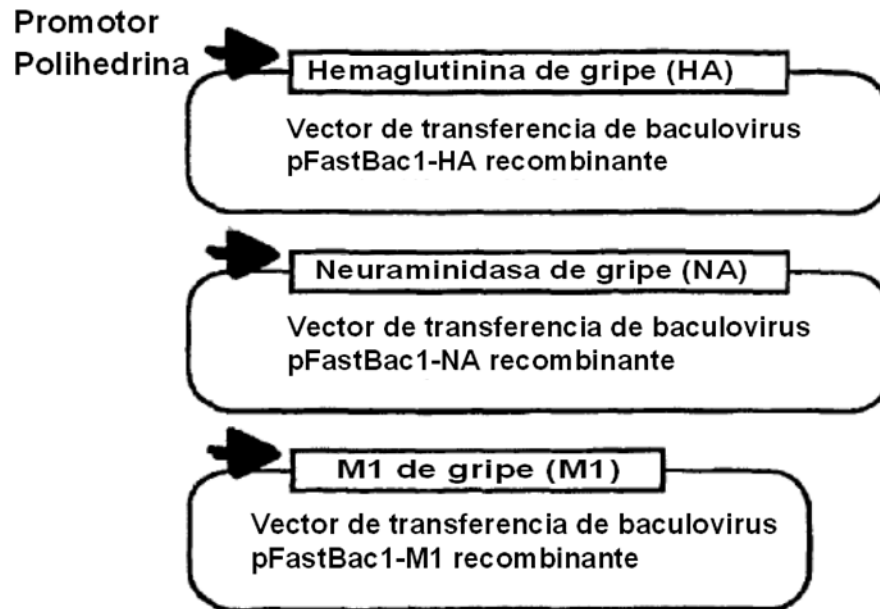
ATGGAAACAATATCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAAT
CTGCATCGGCCACCAAGTCAACAAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATG
TTCCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACA
AGCCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCC
TTCTTGTGACCTGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTG
TAAATGGAACGTGTTACCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGT
TCCGCTAGTTCCCTACCAAAGAATCCAAATCTTCCAGACACAACCTGGAATGTGACTTACAC
TGGAACAAGCAGAGCATGTTTCAGGTTCAATCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAAGA
GCGGTTTTTACCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAAATAACAGGGGAAAAGAGCATTCTTTTC
GTGTGGGGCATAACATCACCCACCCACCTATACCGAGCAAAACAAATTTGTACATAAGAAACGA
CACAACAACAAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAAGTGATAGGGCCAA
GGCCCCCTTGTCATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCGGTACTAAAACCAAGGC
CAAACATTGCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTC
AGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAAT
GTCAGACTGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCA
TTTGGAACCTGCCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCAGTCGGTCTGAGGAA
CGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTCCATAGAAGGAGGTT
GGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATG
GCTGCAGATAGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATAT
AGTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTCAGTGAGGTTGAAACTA
GACTCAATATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACAAGACGTATGGGCATATAATGCA
GAATTGCTAGTACTACTTGAAAATCAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAACGTGAACAA
TCTATATAACAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTT
TCGAGCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGCATGGAAACAATTTCGGAACGGGACCTATAAT
AGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGA
ATCTGAGGGAACTTACAAAATCCTCACCATTATTTCGACTGTGCCTCATCTCTTGTGCTTG
CAATGGGGTTTGCTGCCTTCCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATGCAACATT
TGTATATAA

FIGURA 2

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAA
AGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAGGATGTTTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTC
TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTT
GTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGATTTGTCCAAAATGC
CCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTGA
AGAGGGAAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACTGGTGCGCTT
GCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACCGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTCTTGG
CCTAGTATGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATGCCCAACATCGGTCCACAGGCAGATGG
CGACTACCACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCT
AAGGCCATGGAGCAGATGGCTGGATCAAGTGAGCAGGCAGCAGAAGCCATGGAAGTCGCAAG
TCAGGCTAGGCAAATGGTGCAGGCTATGAGGACAATTGGGACTCACCTAGTTCCAGTGCAG
GTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTTGCAGGCTTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATG
CAGAGATTCAAGTGA

FIGURA 3

(A)



(B)

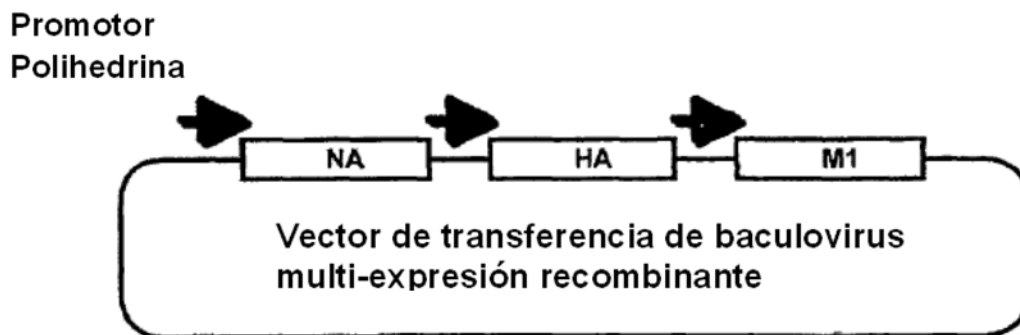


FIGURA 4

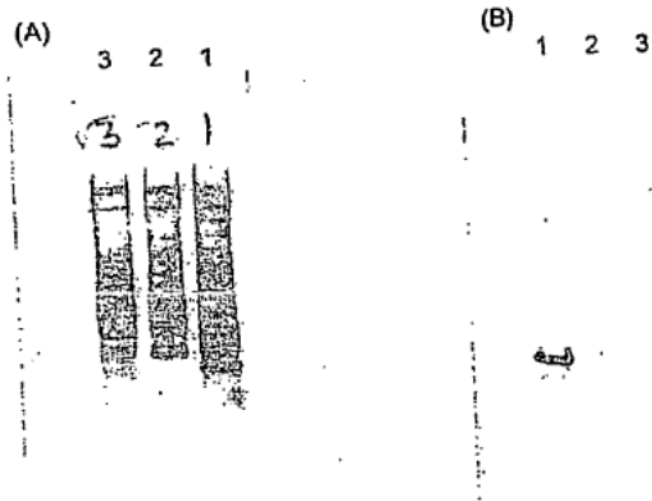


FIGURA 5

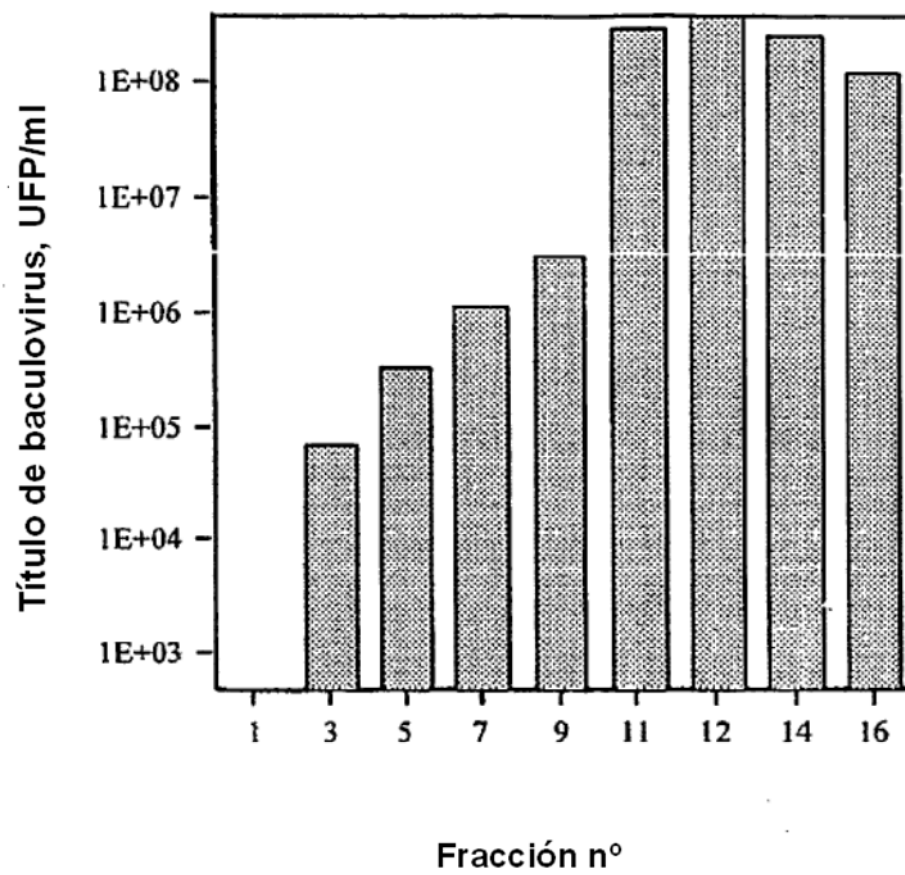


FIGURA 6

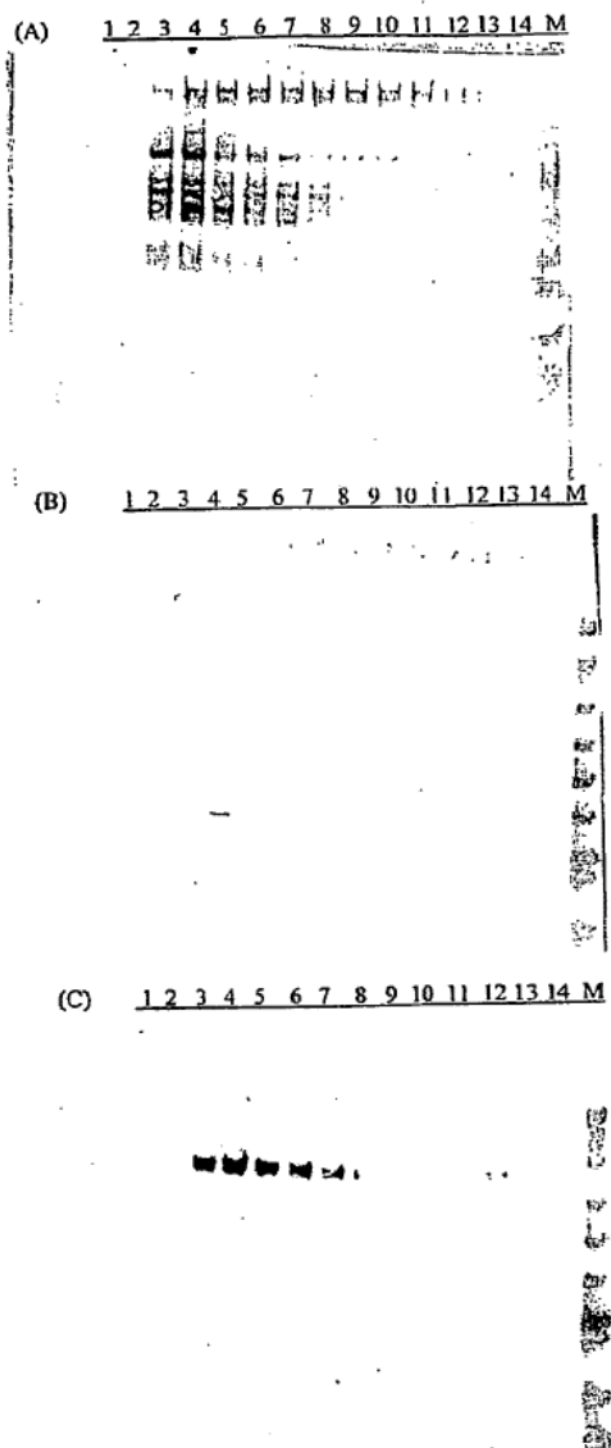


FIGURA 7

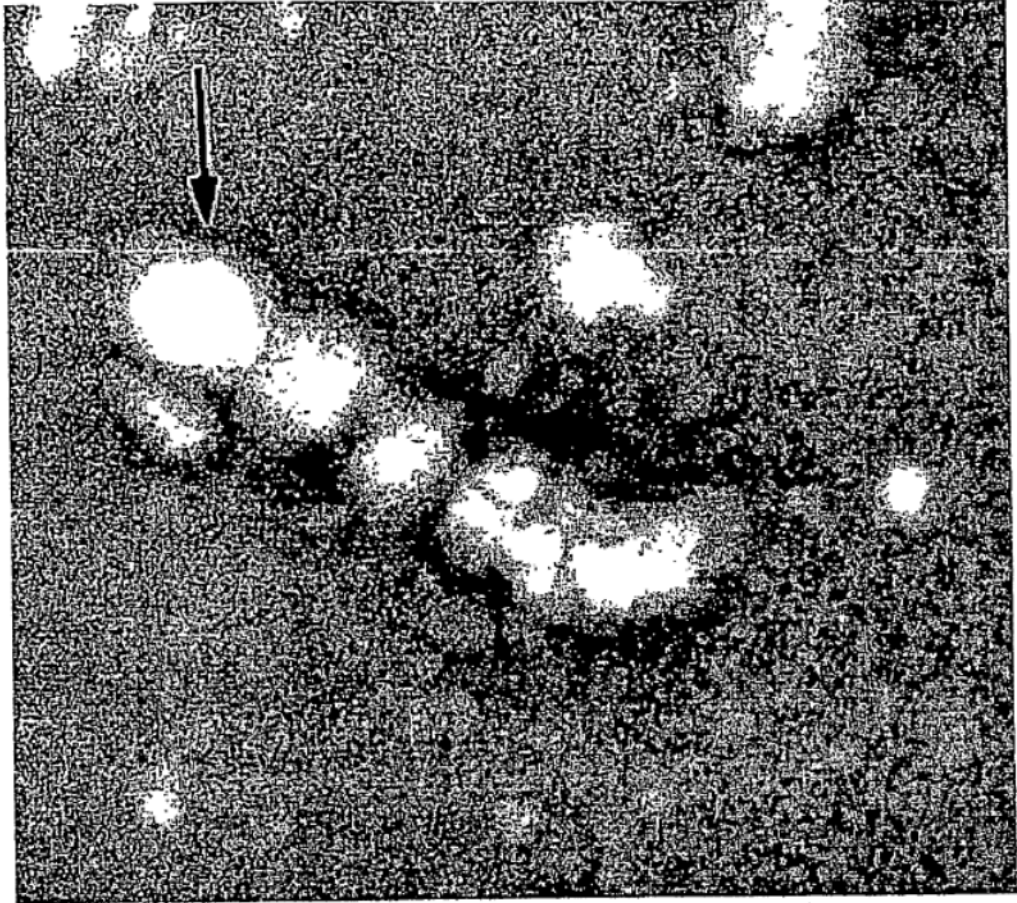


FIGURA 8

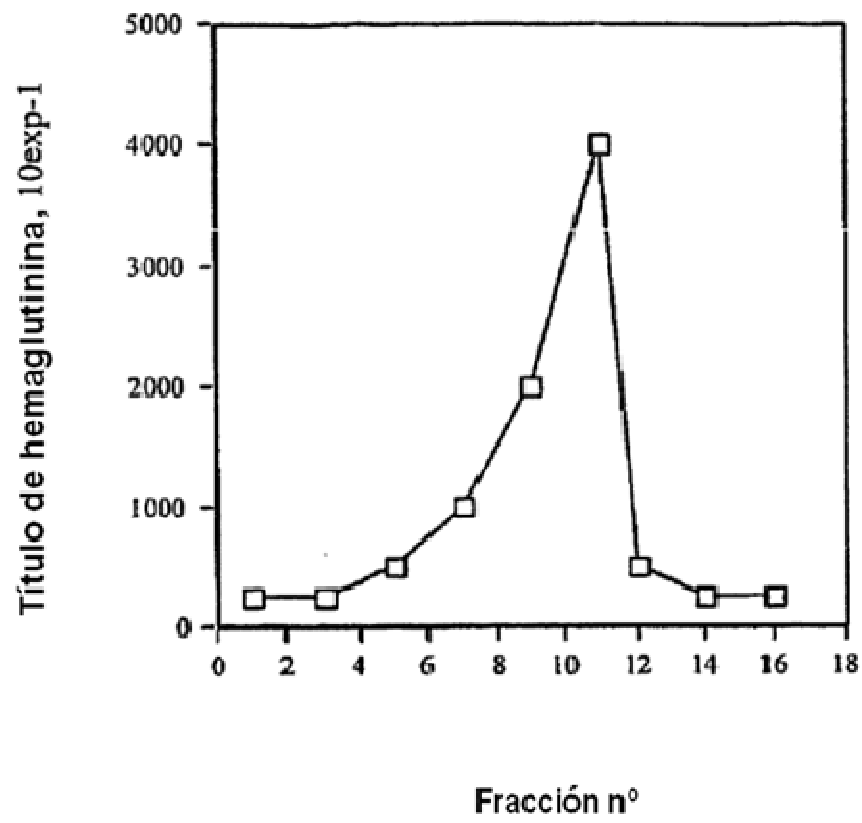


FIGURA 9.

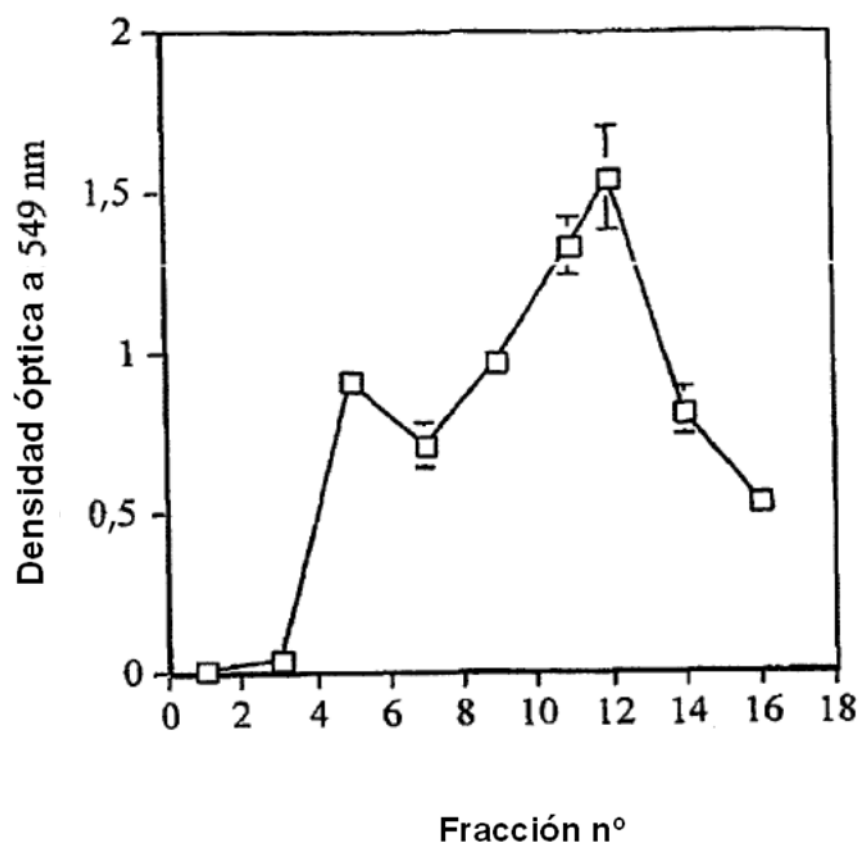


FIGURA 10

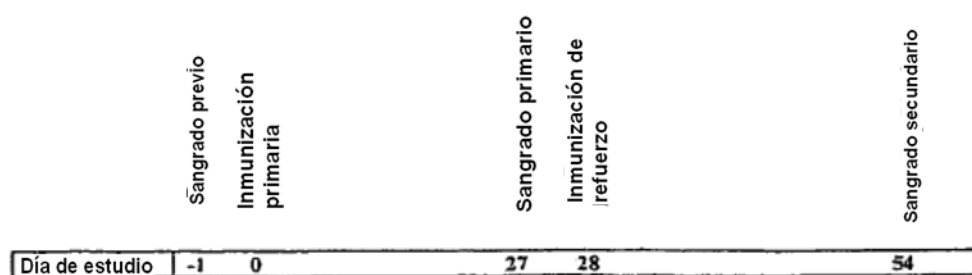


FIGURA 11

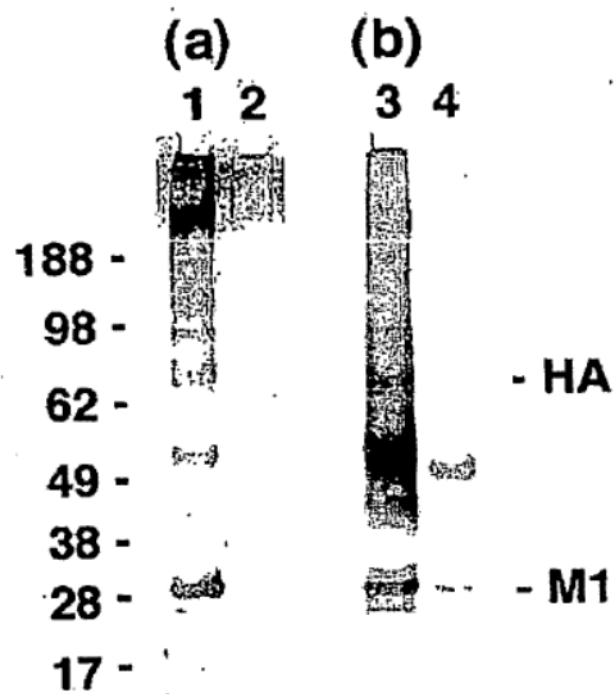


FIGURA 12

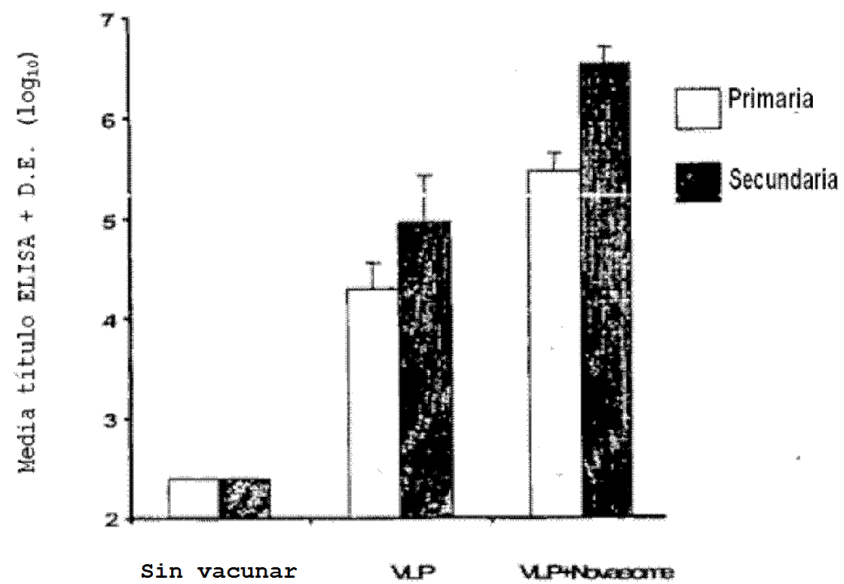


FIGURA 13

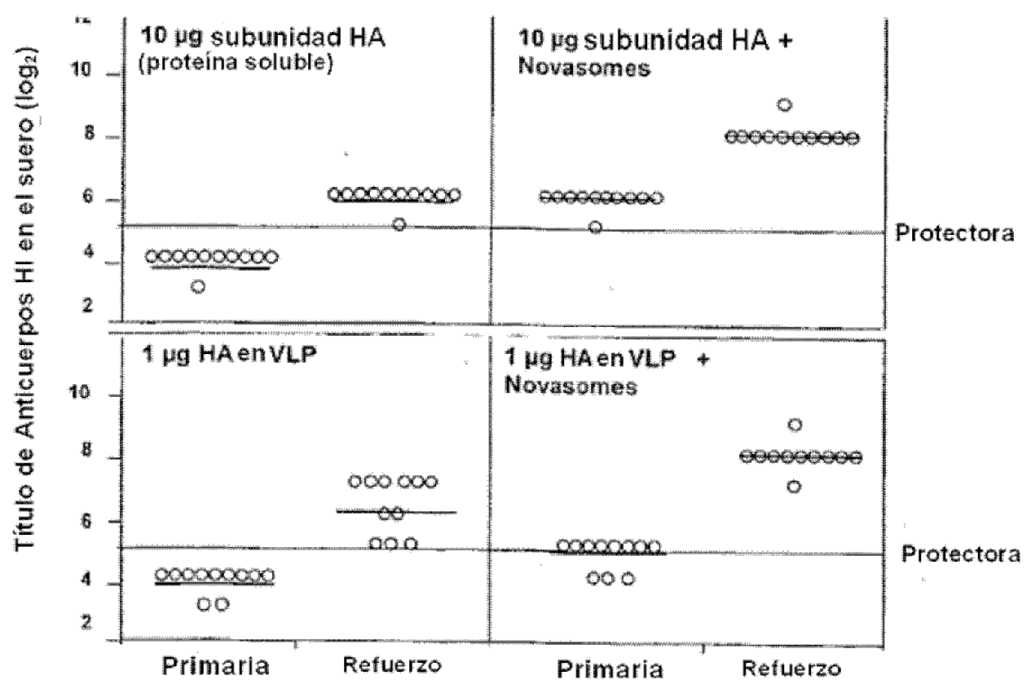


FIGURA 14

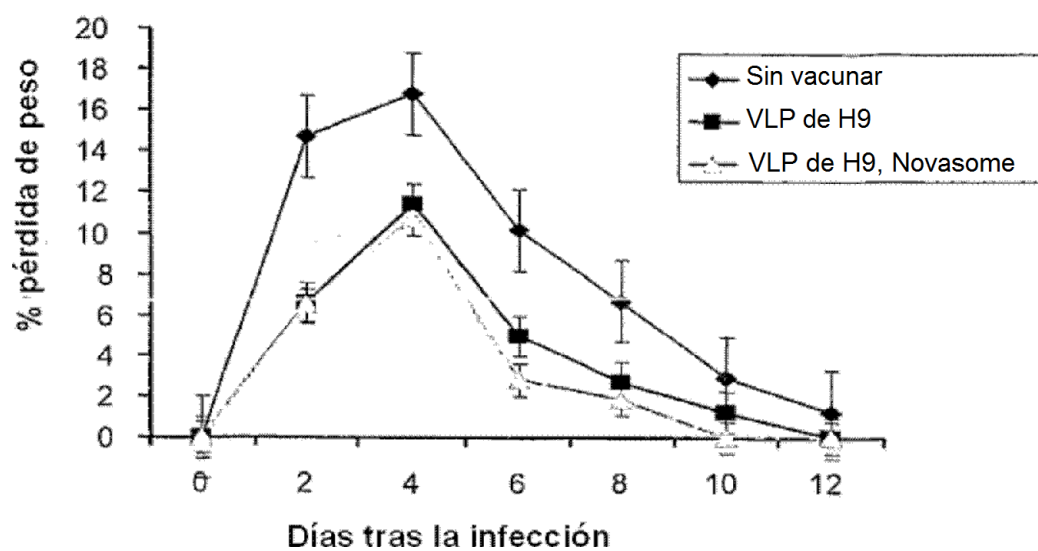


Figura 15

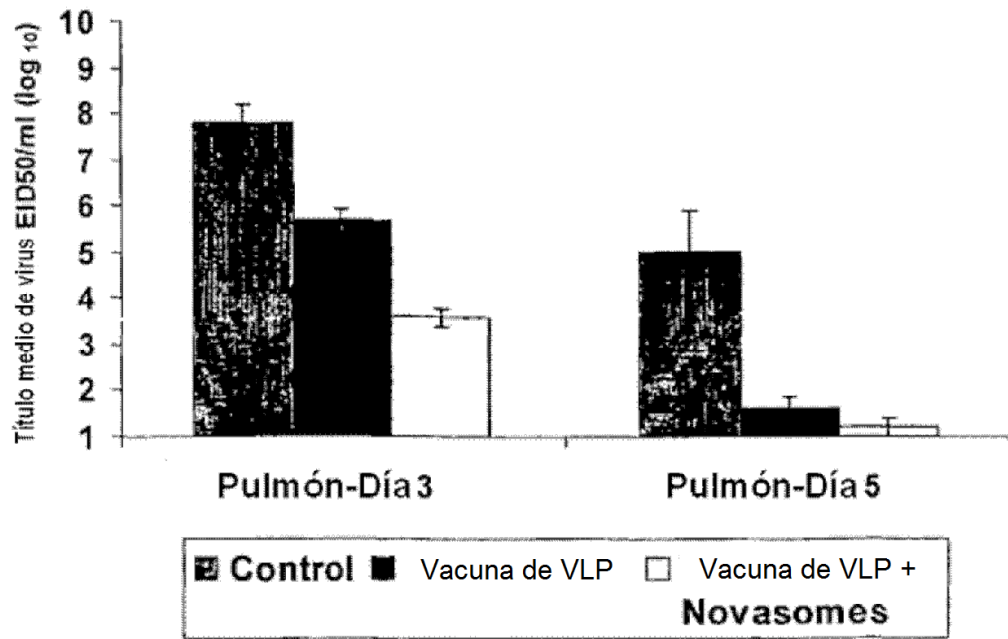


FIGURA 16

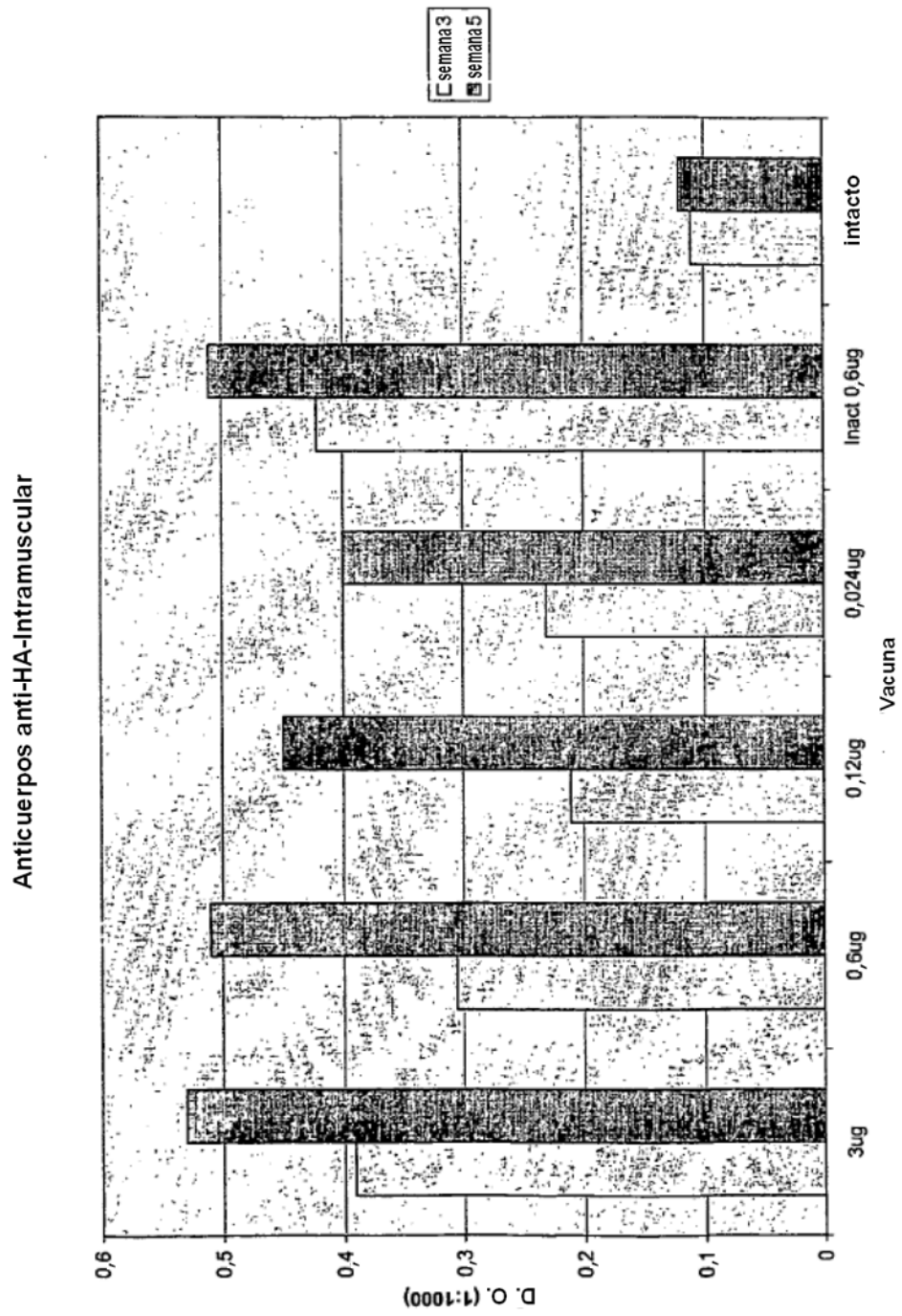


FIGURA 17 A

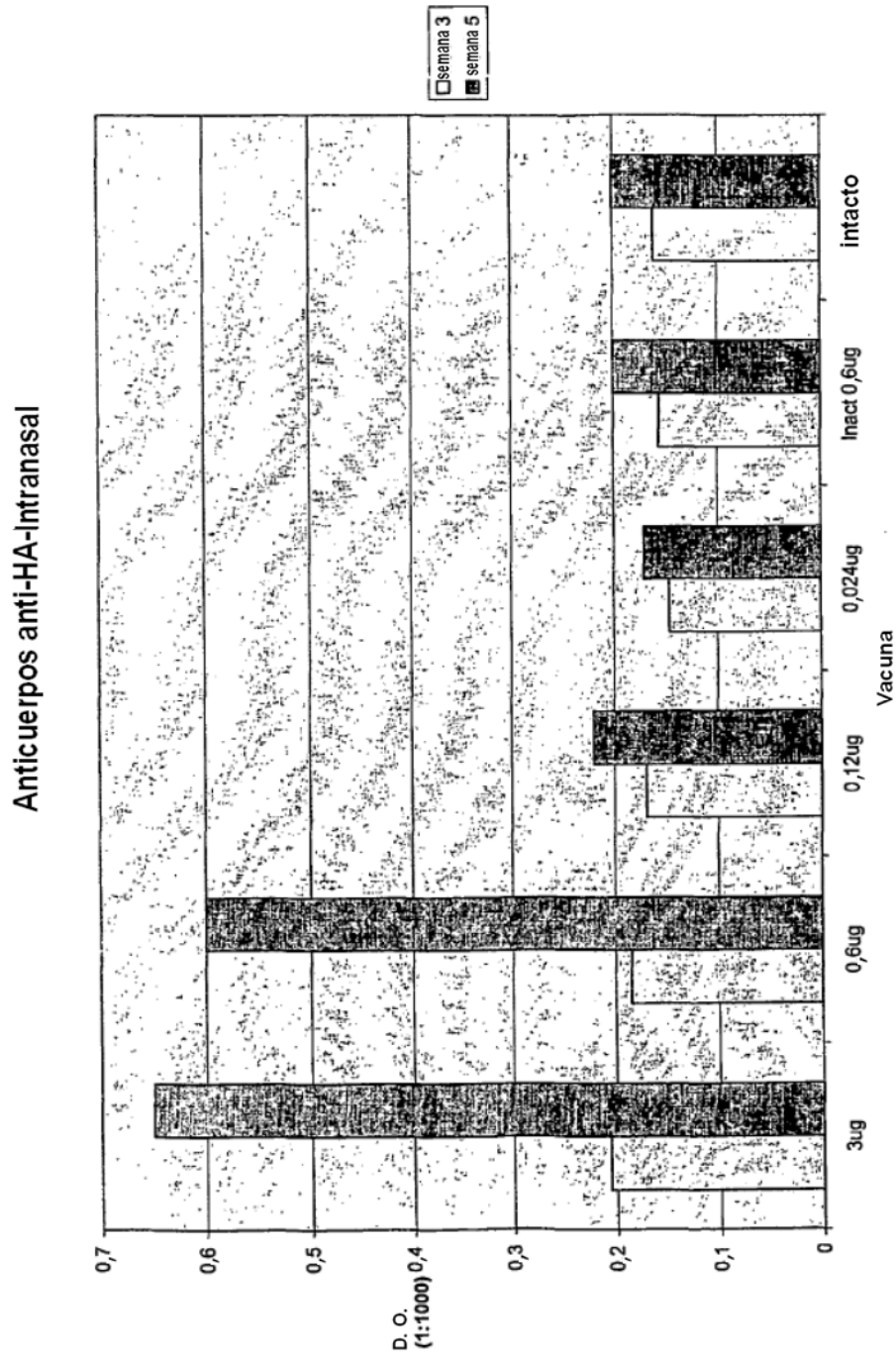


FIGURA 17 B

Estudio 1B-Anti-NA, Fujian VLP (H3N2)

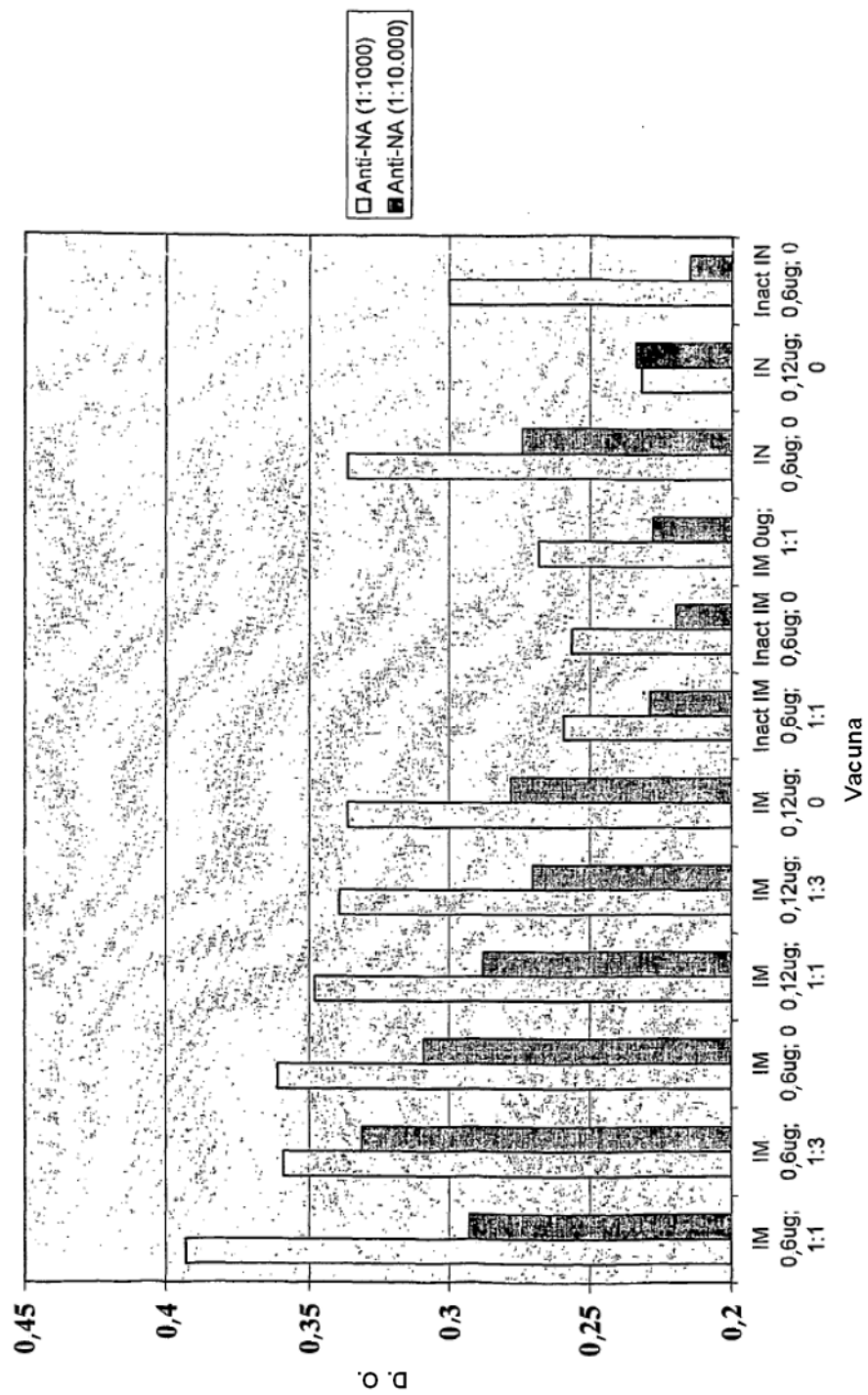


FIGURA 17 C

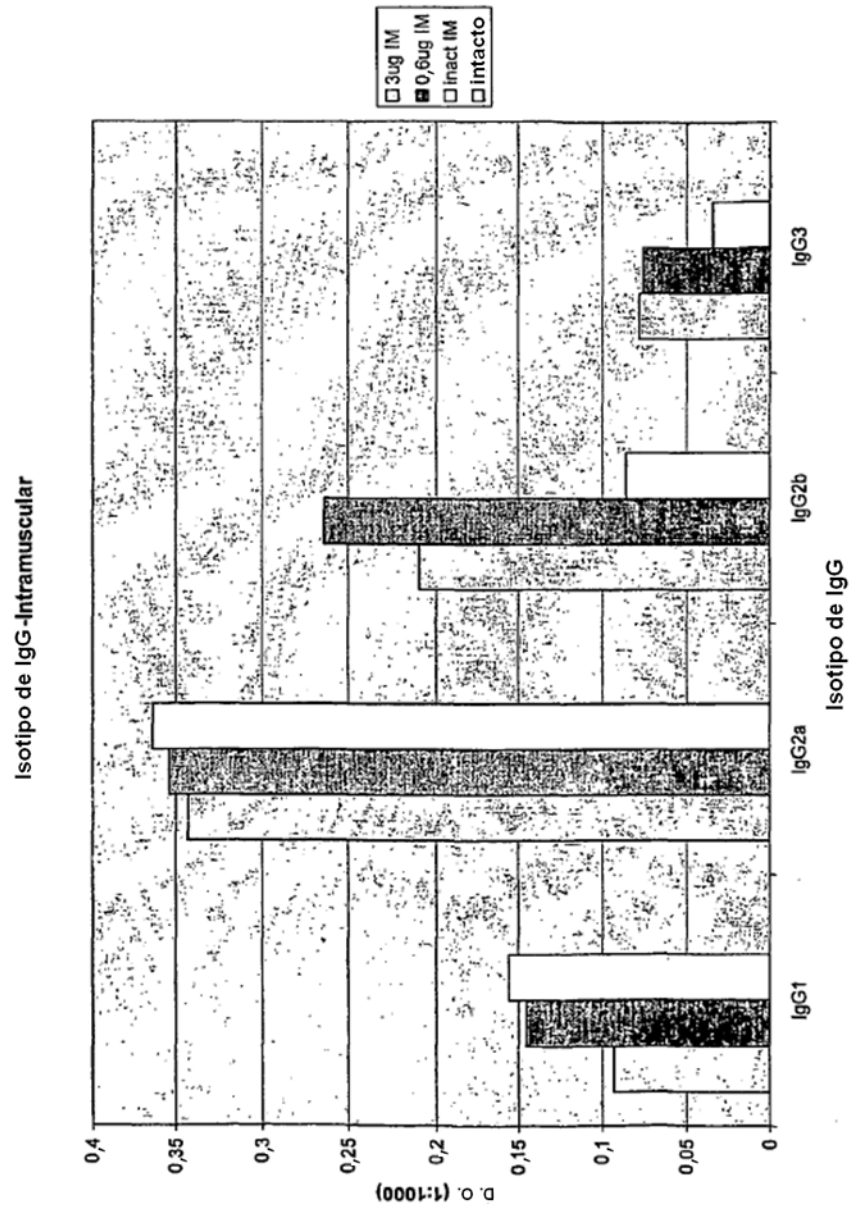


FIGURA 18 A

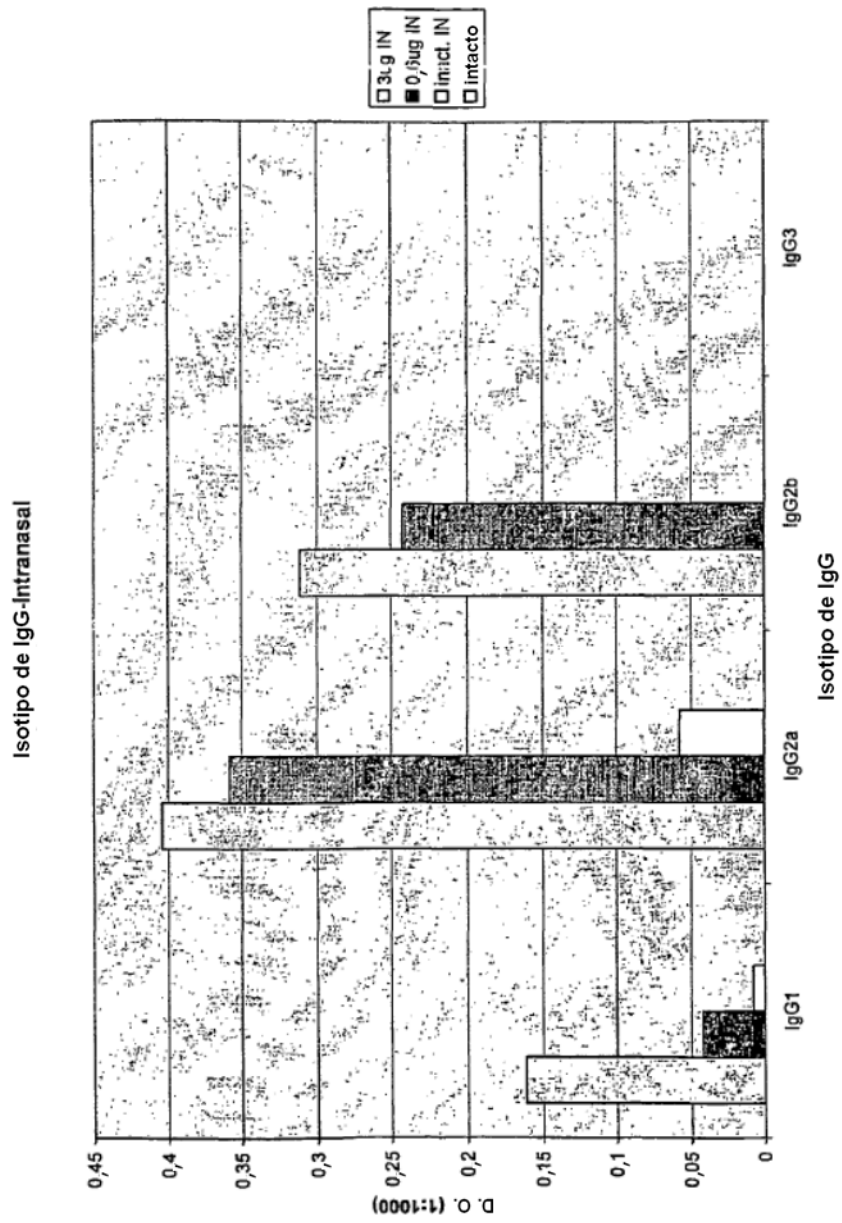


FIGURA 18 B

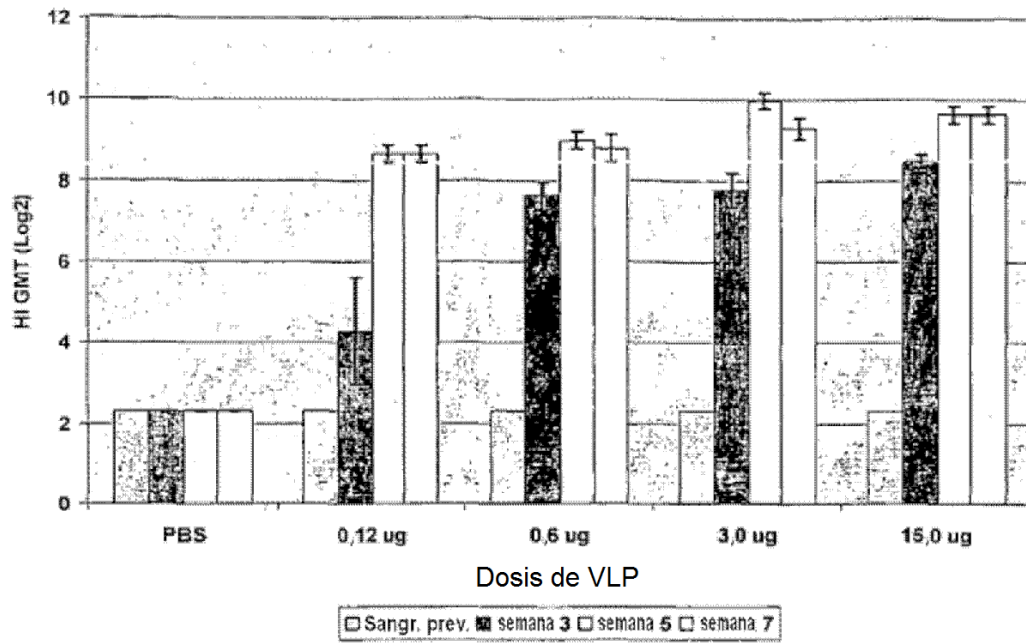


FIGURA 19

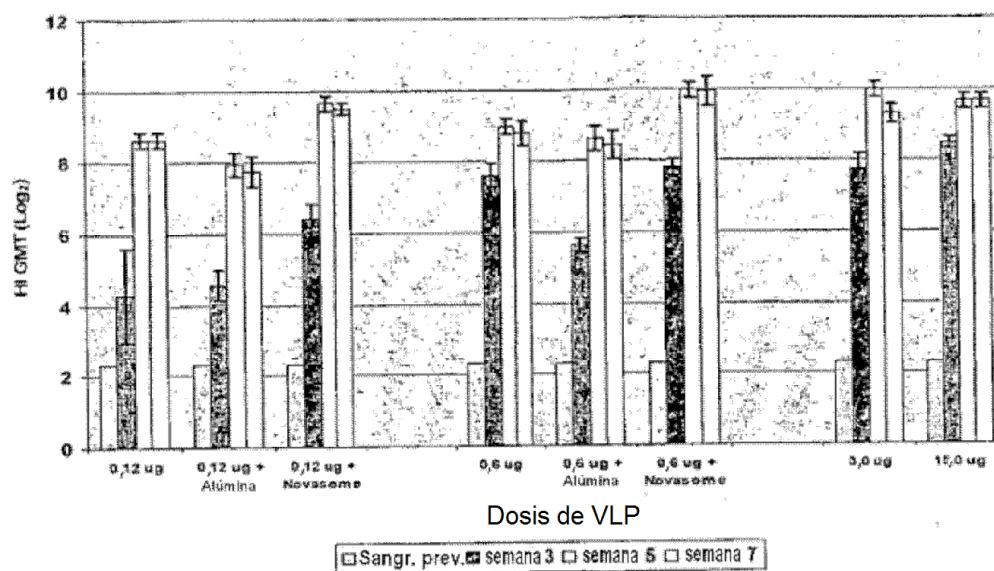


FIGURA 20 A

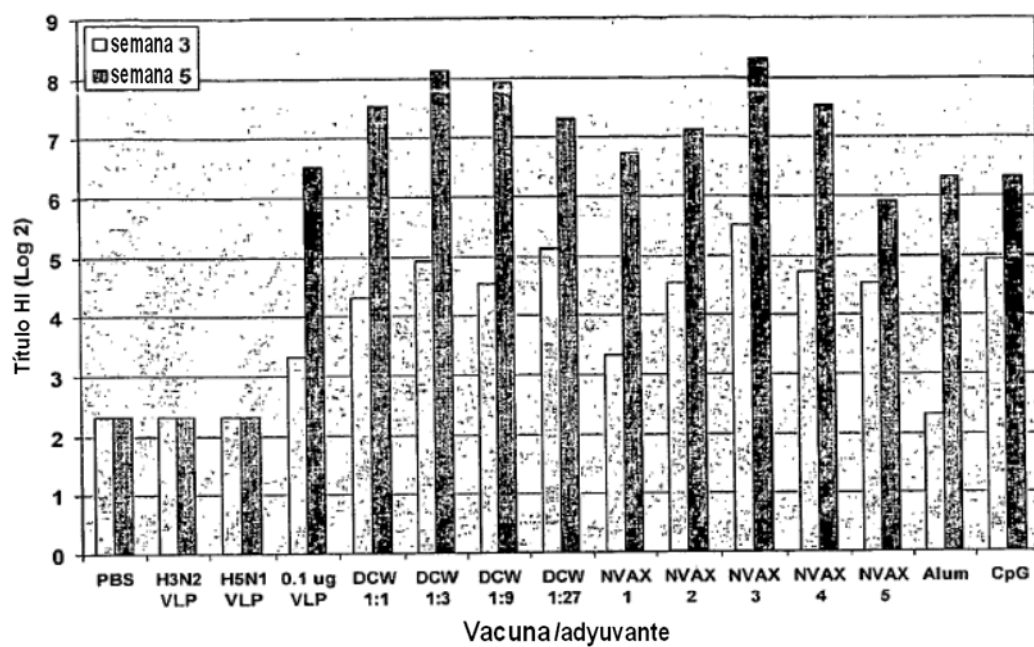


FIGURA 20 B

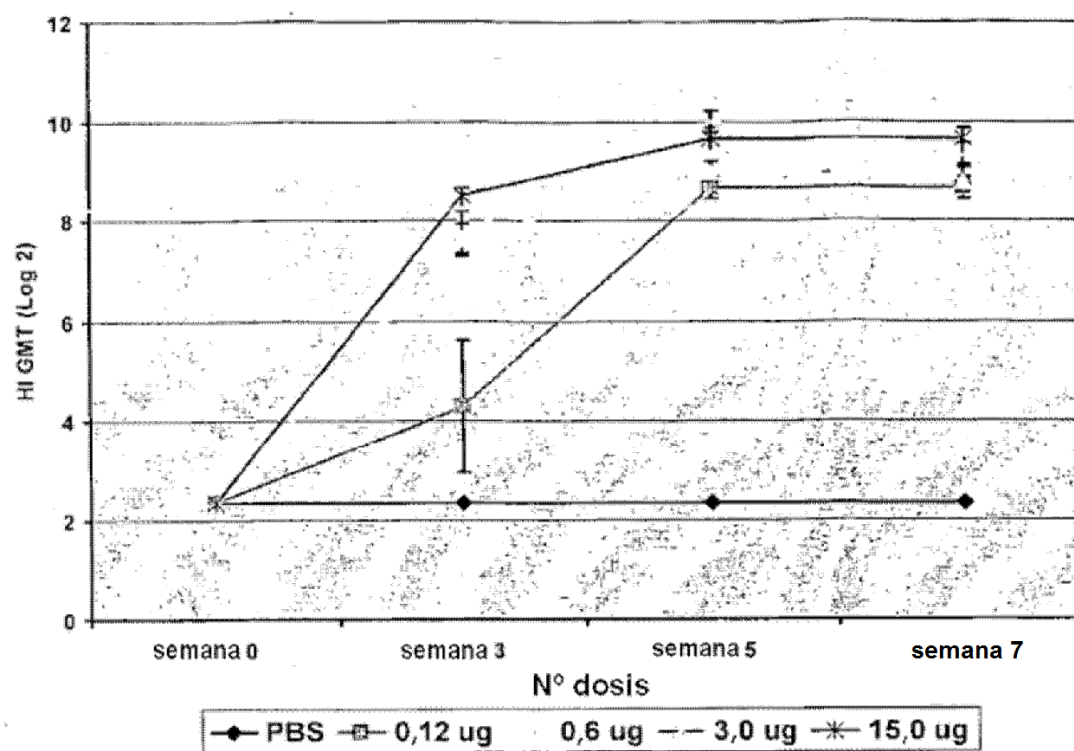


FIGURA 21

Respuesta a la dosis de VLP H9N2 en Hurones

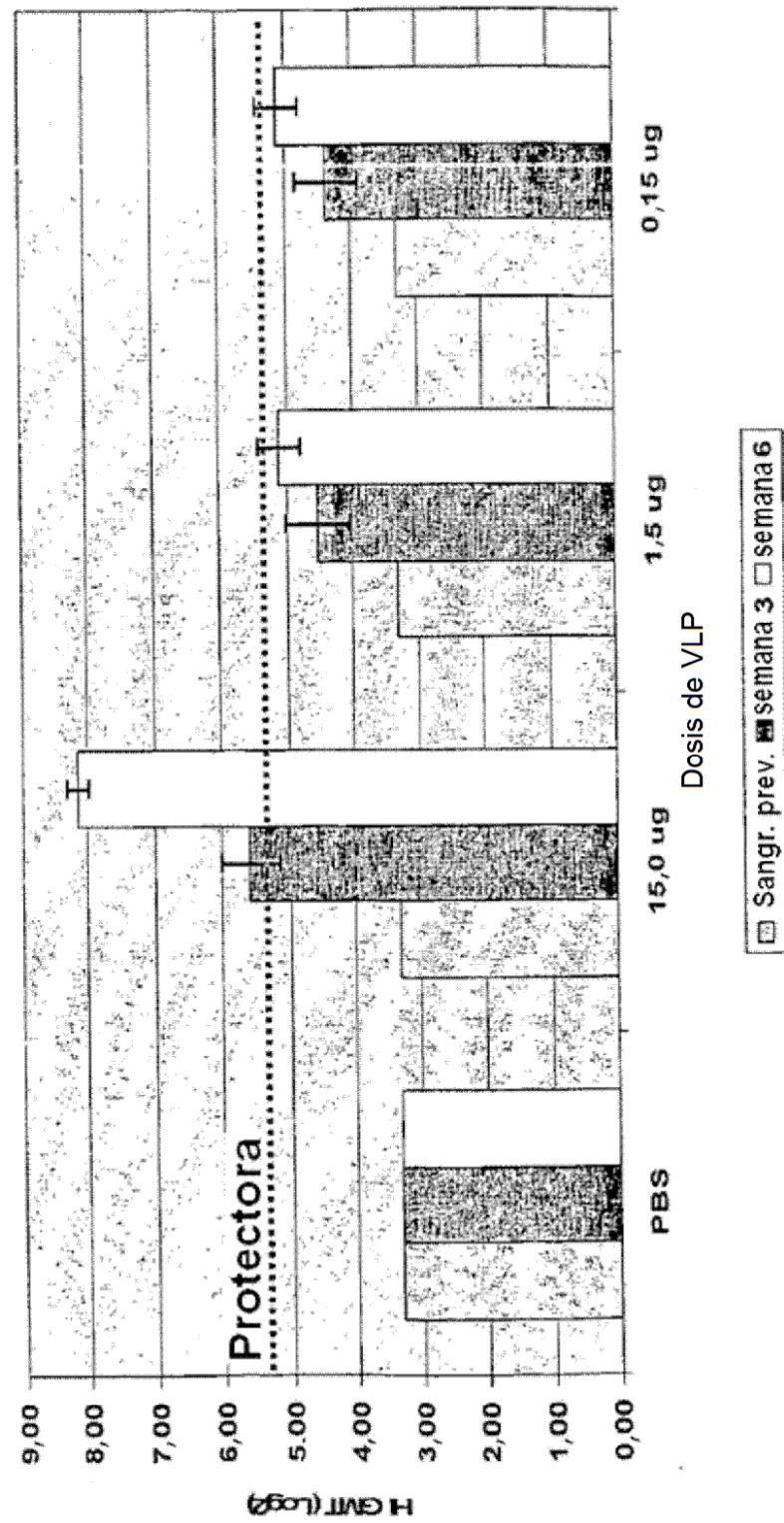
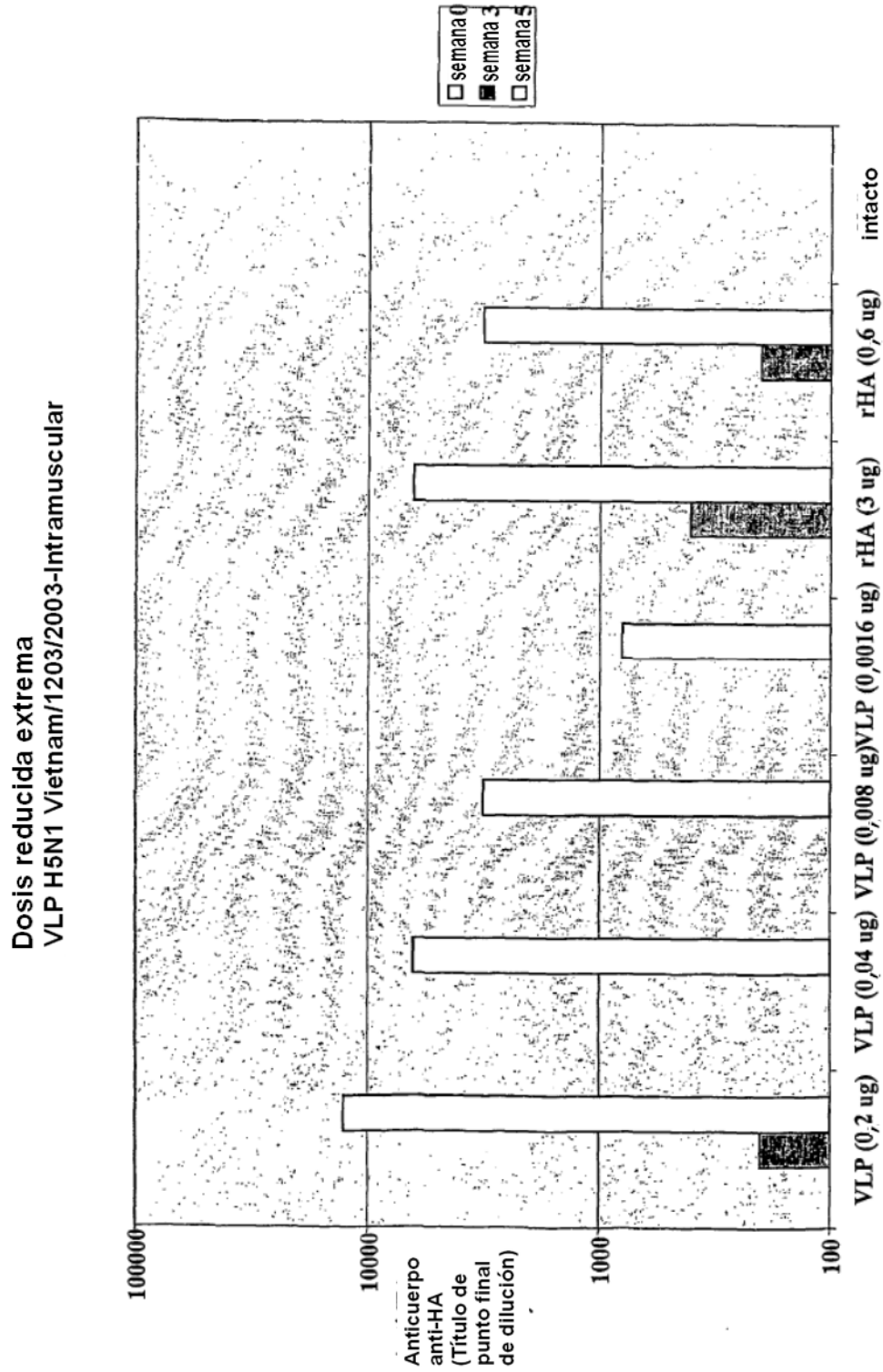


FIGURA 22

Tabla X. Títulos de Inhibición de la Hemaglutinina – Hurones

Vacuna	<u>H3N2</u>				<u>H1N1</u>
	CA/04	Tuj/02	Well/01	Pan/99	NC/99
<u>Intramuscular</u>					
VLP (15ug)	640	905	508	40	10
VLP (3 ug)	160	640	226	57	10
VLP (0,6ug)	50	320	143	57	10
VLP (0,12 ug)	10	184	70	50	10
rHA (15 ug)	80	254	143	56	10
Falso	10	10	10	10	10

FIGURA 23



Vacuna

FIGURA 24

Estudio 2A-Dosis reducida extrema
VLP H5N1 Vietnam/1203/2005

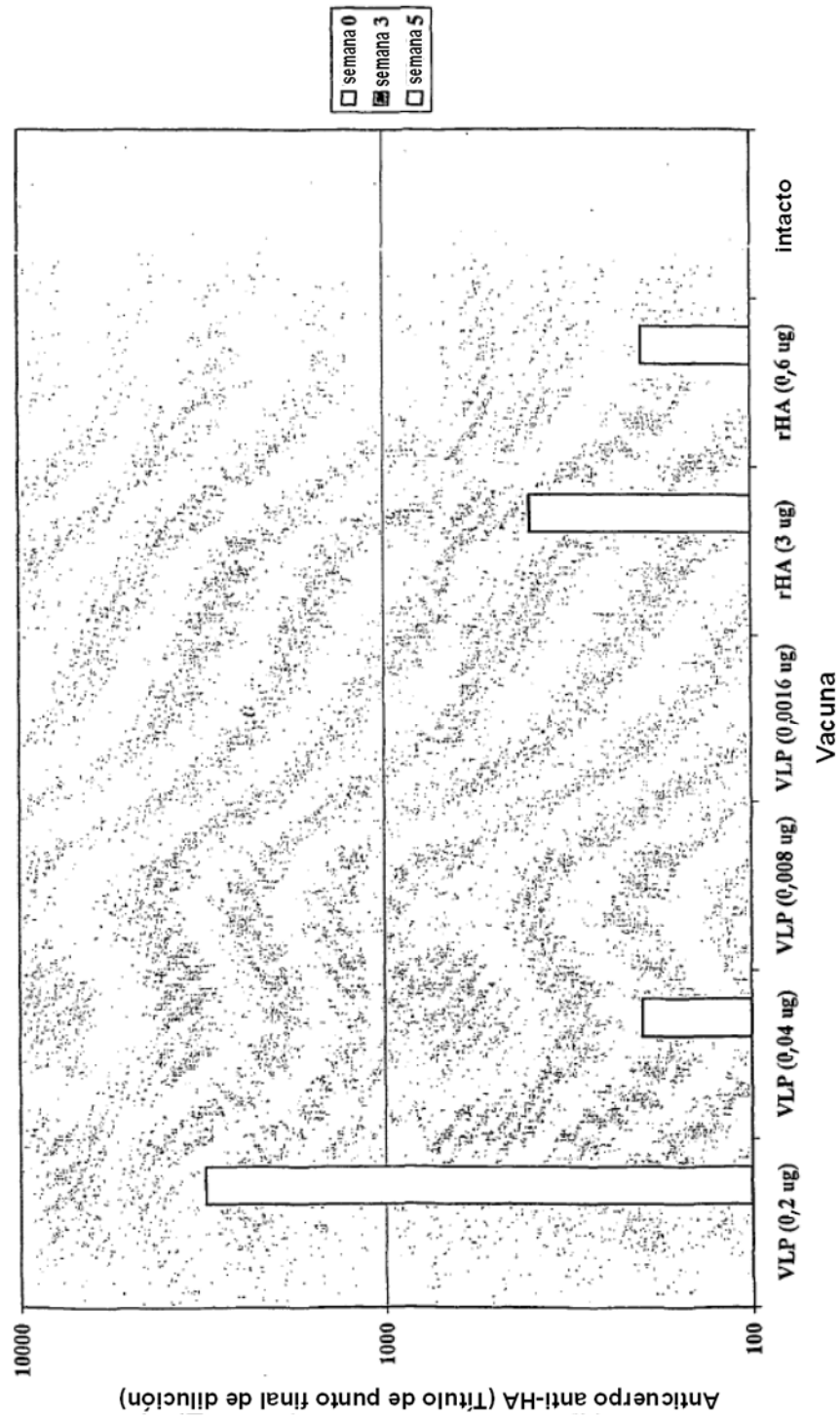
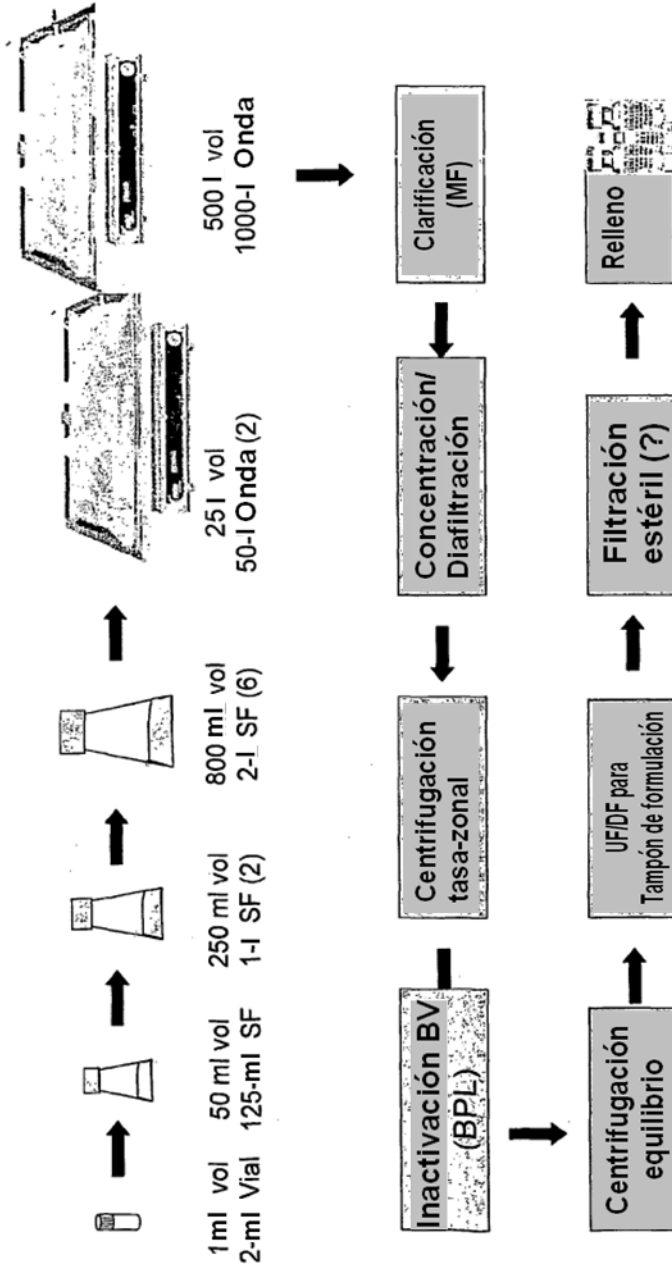


FIGURA 25

Proceso de producción portátil y desechable para la producción de vacuna VLP de gripe



El proceso de cultivo celular corriente arriba y las operaciones unitarias corriente abajo están dirigidos a ser portátil, desechable, y escalable, con capacidad de aumento.

FIGURA 26

403421 VZ/06

Estudio 1A: VLP Fujian (H3N2) vs. Virus inactivado: Intramuscular
Provocación con A/Aichi/2/68x31

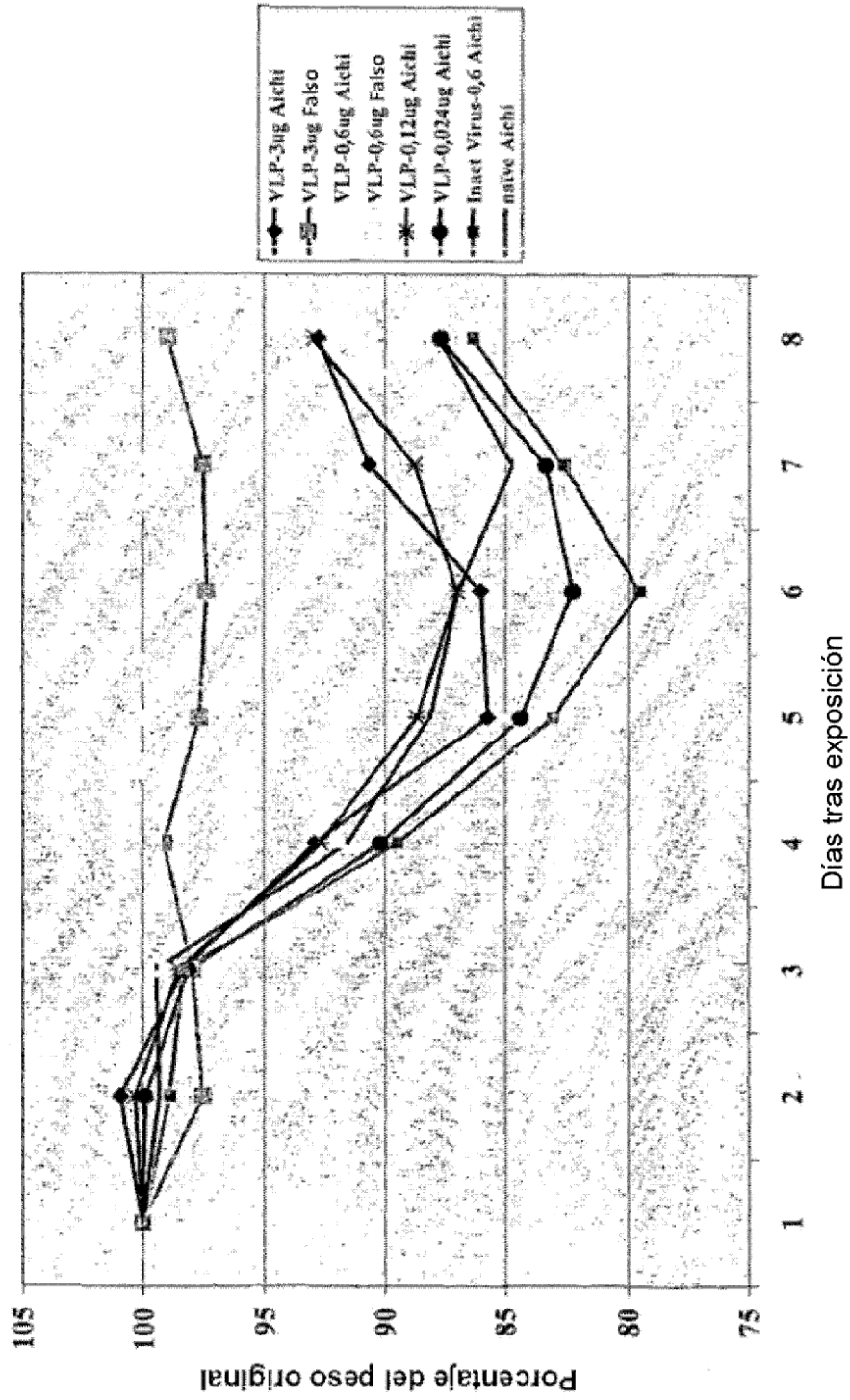


FIGURA 27

Estudio 1A: VLP Fujian (H3N2) vs. Virus inactivado: Intranasal
Provocación con A/Aichi/2/68x31

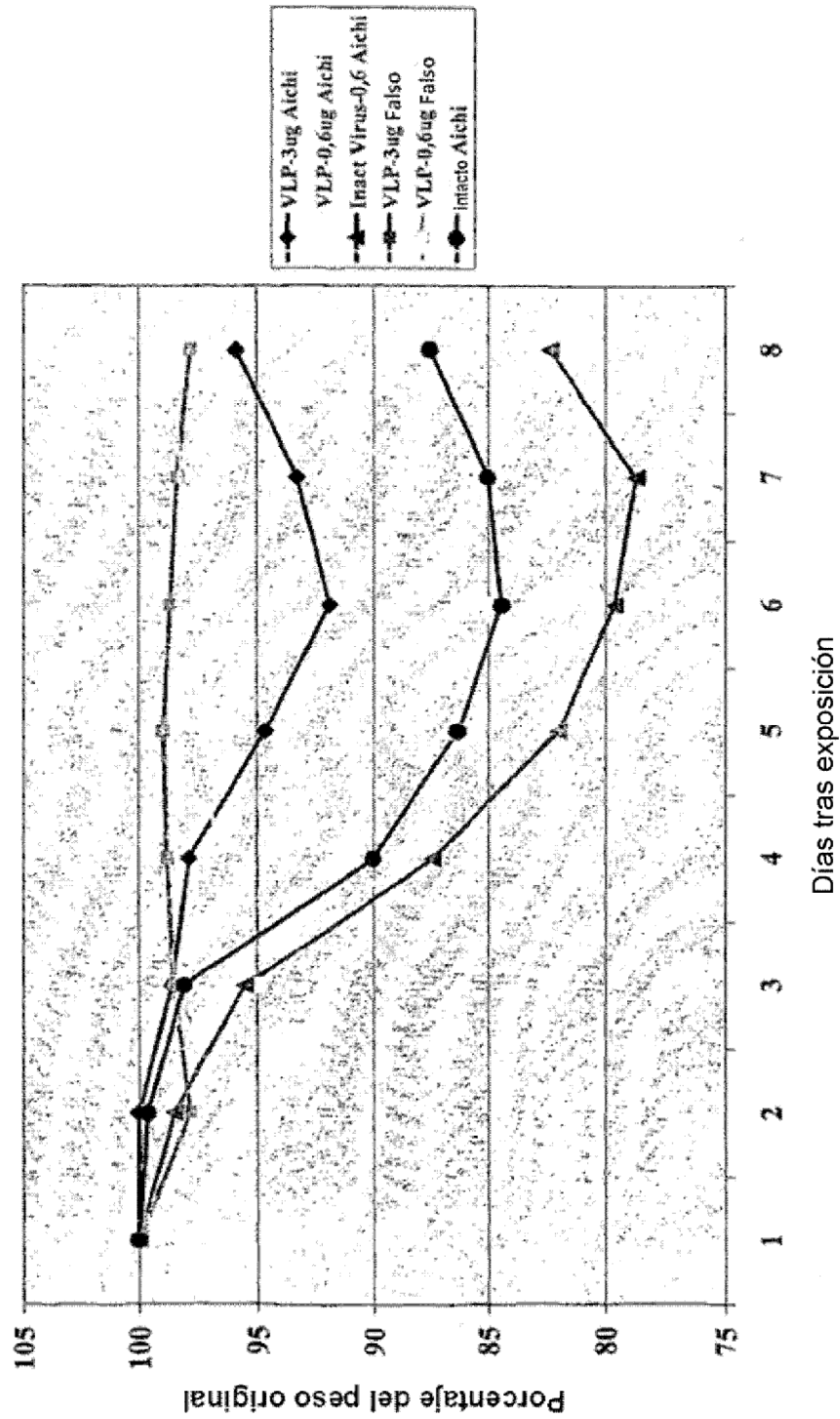


FIGURA 28

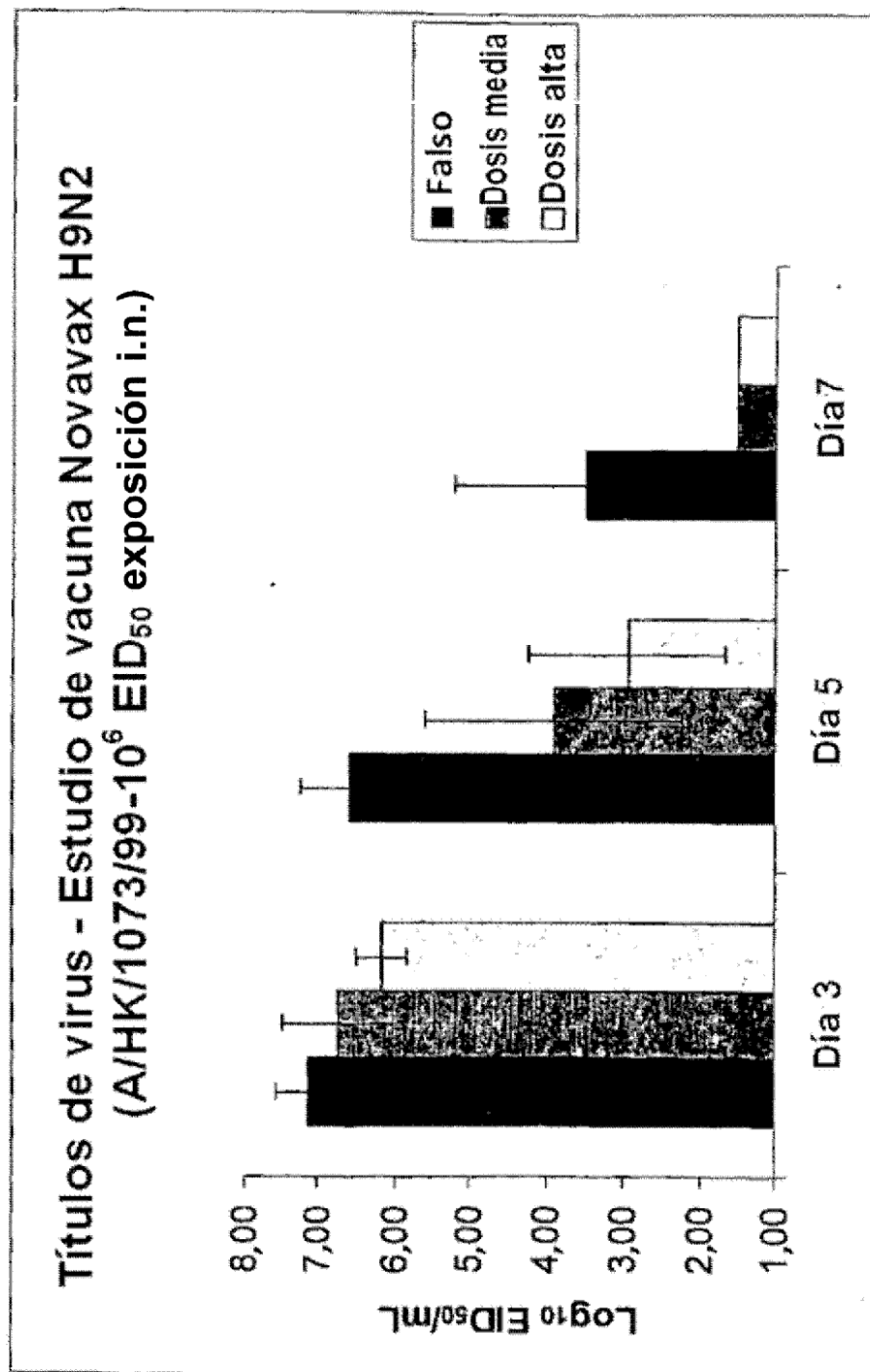


FIGURA 29

Dosis respuesta HAI H3N2 - IM - Ratón
A/Fujian/411/2002

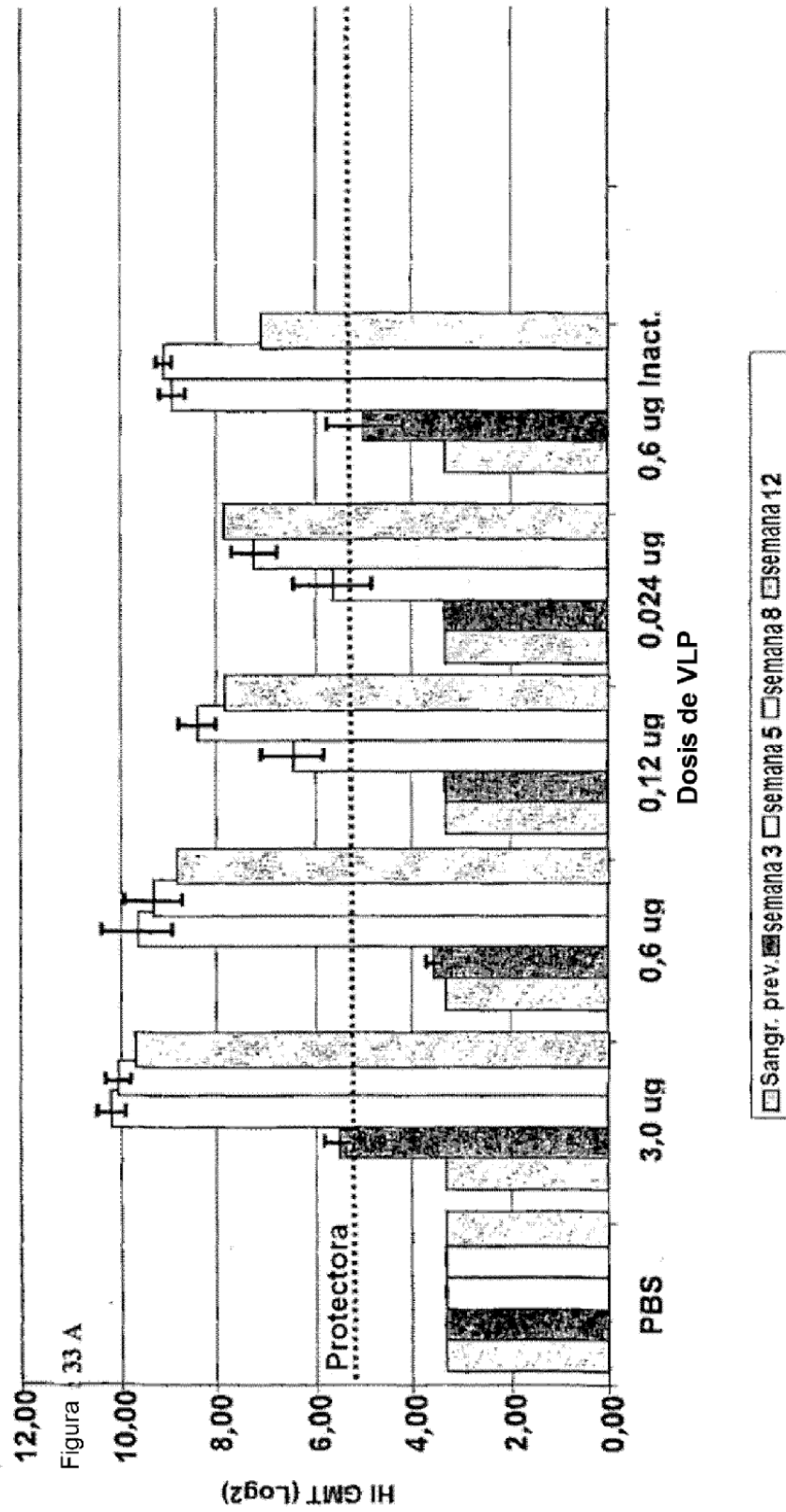


FIGURA 30 A

Título de HI para A/Fujian/411/2002 (H3N2) tras inoculación intranasal de VLP de H3N2

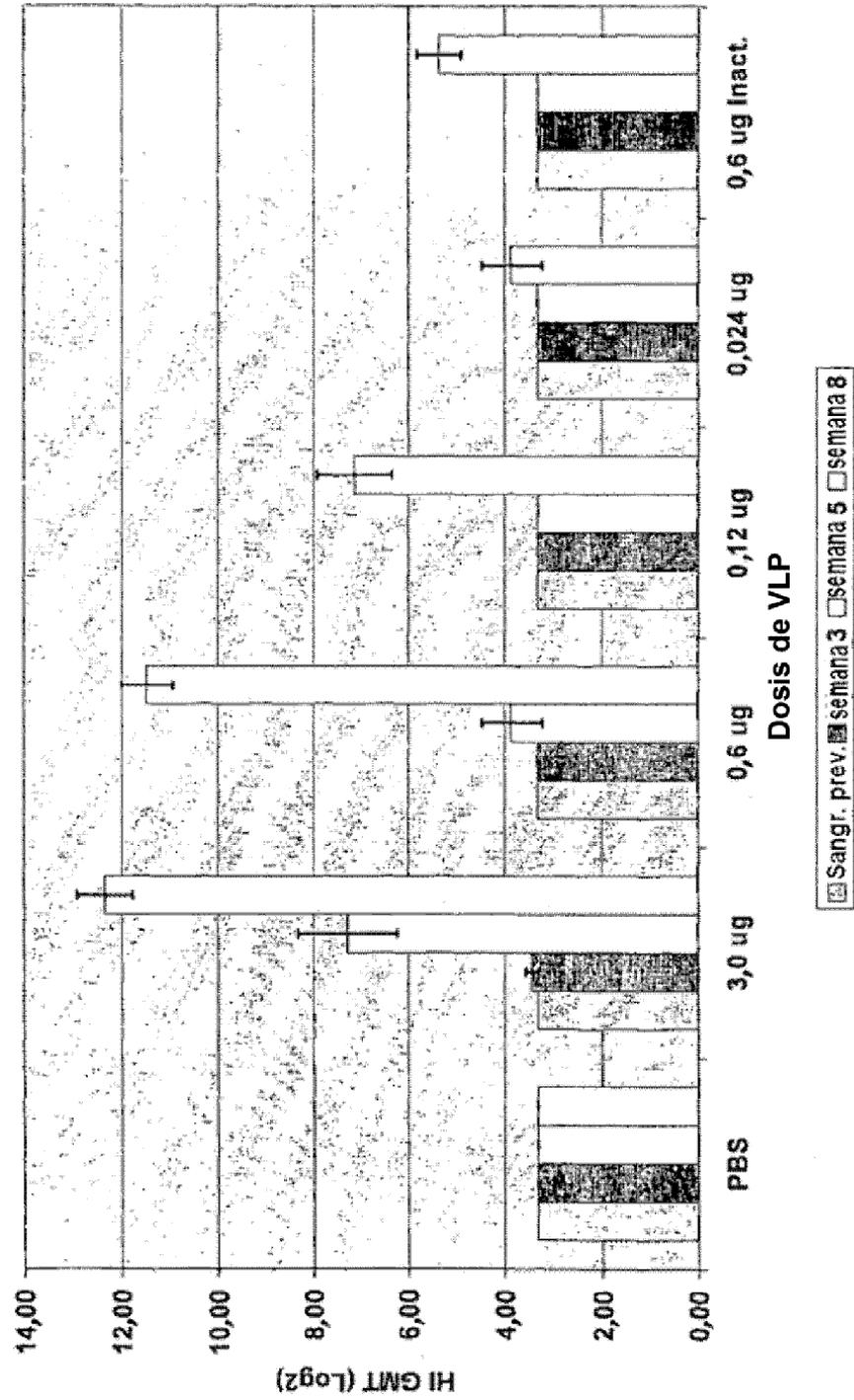


FIGURA 30 B

Título de HI para A/Panamá/2007/99 (H3N2) tras inoculación intramuscular de VLP de H3N2

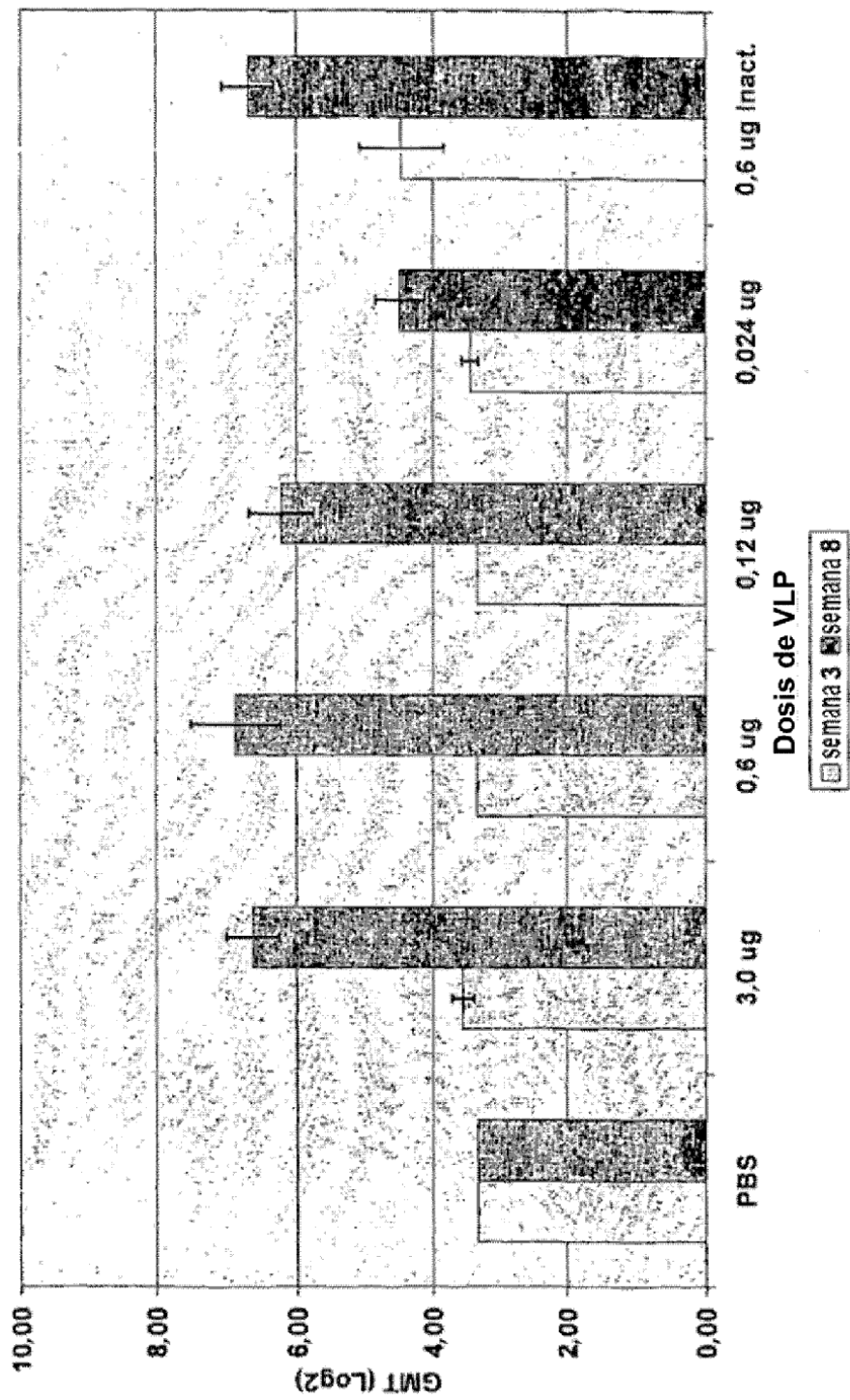


FIGURA 30 C

Título de HI para A/Panamá/2007/99 (H3N2) tras inoculación intranasal de VLP de H3N2



FIGURA 30 D

Título de HI para A/Wyoming/3/03 (H3N2) tras inoculación intramuscular de VLP de H3N2

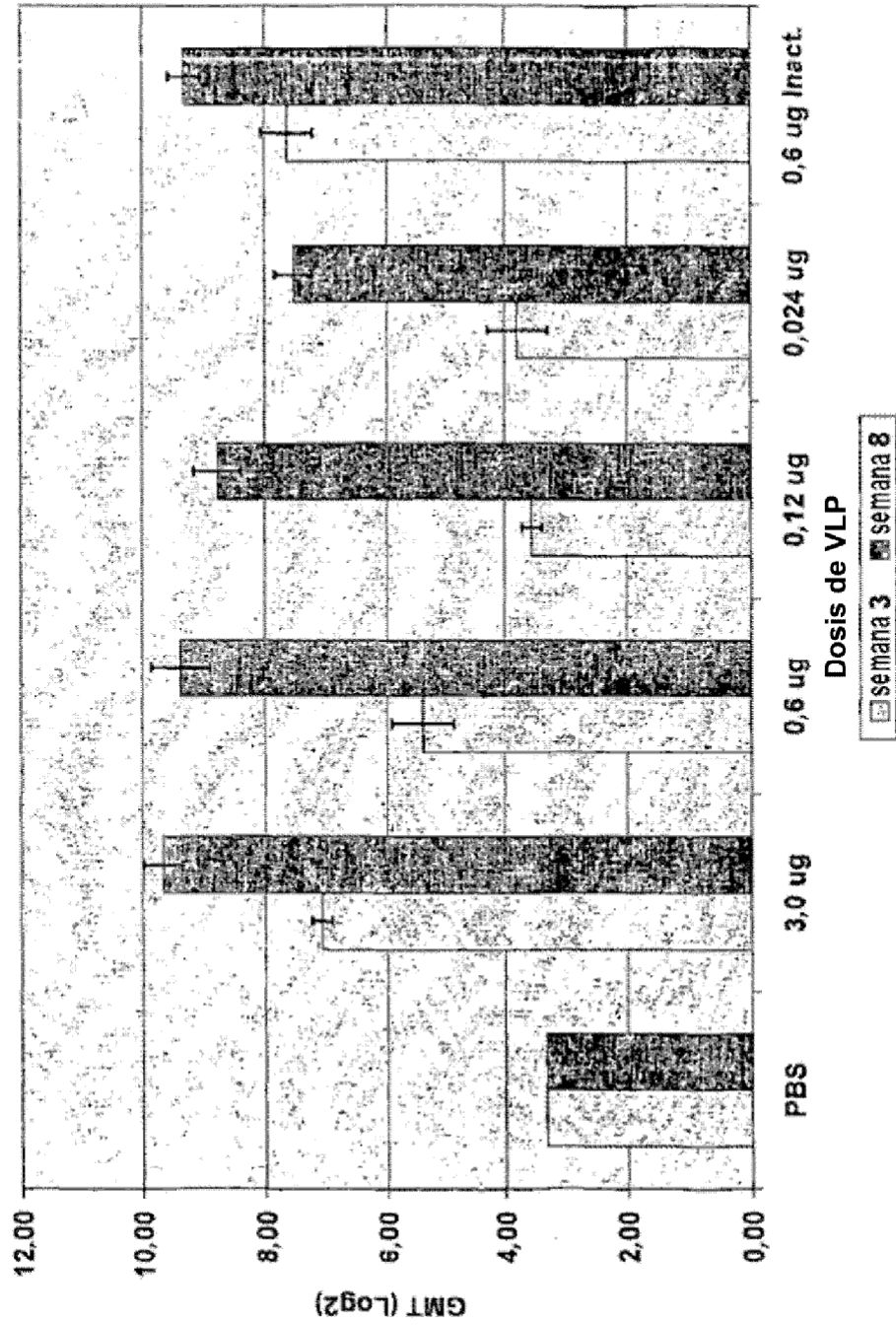


FIGURA 30 E

Título de HI para A/Wyoming/3/03 (H3N2) tras inoculación intranasal de VLP de H3N2

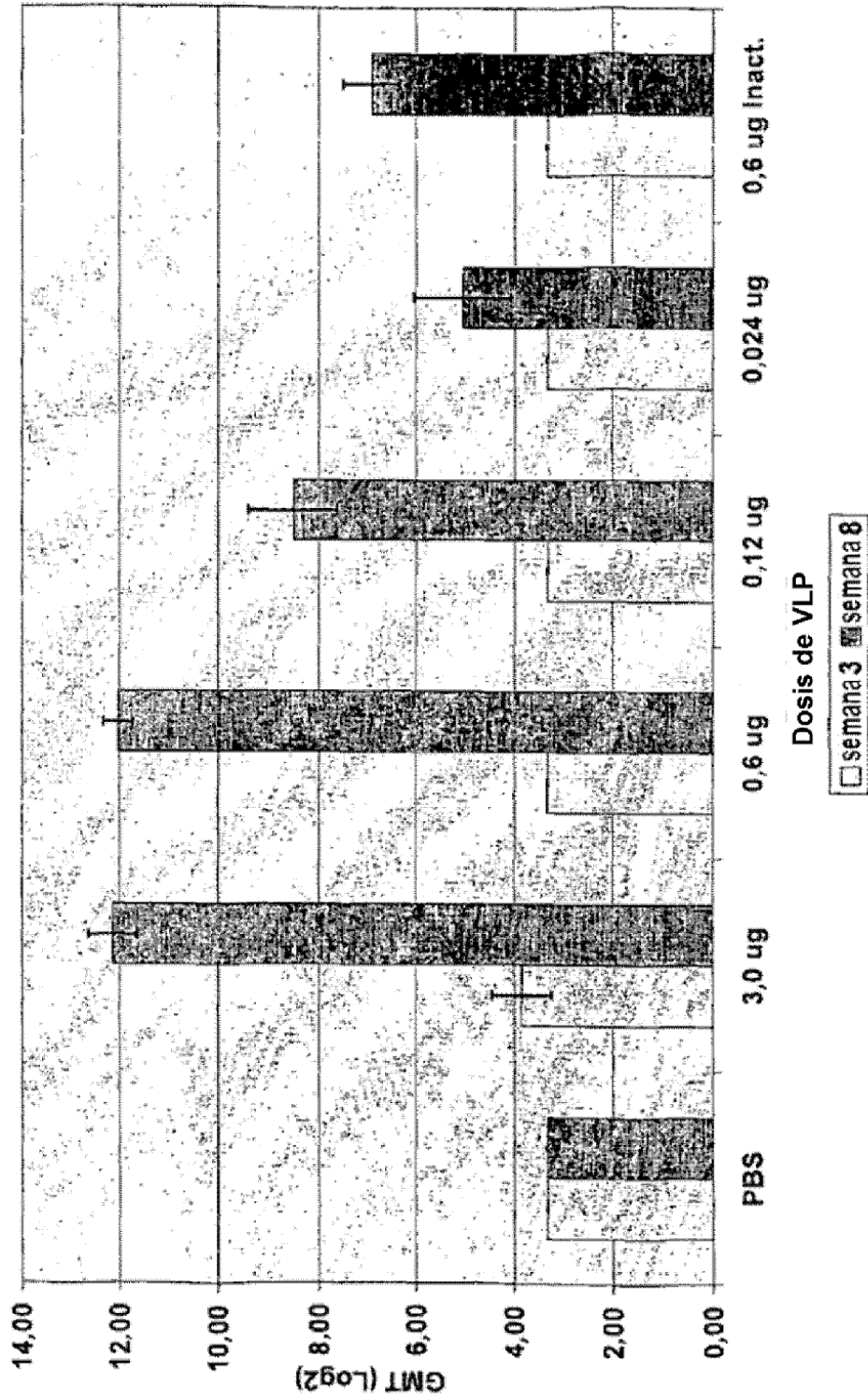


FIGURA 30 F

Título de HI para A/Nueva York/55/2004 (H3N2) tras inoculación intramuscular de VLP de H3N2

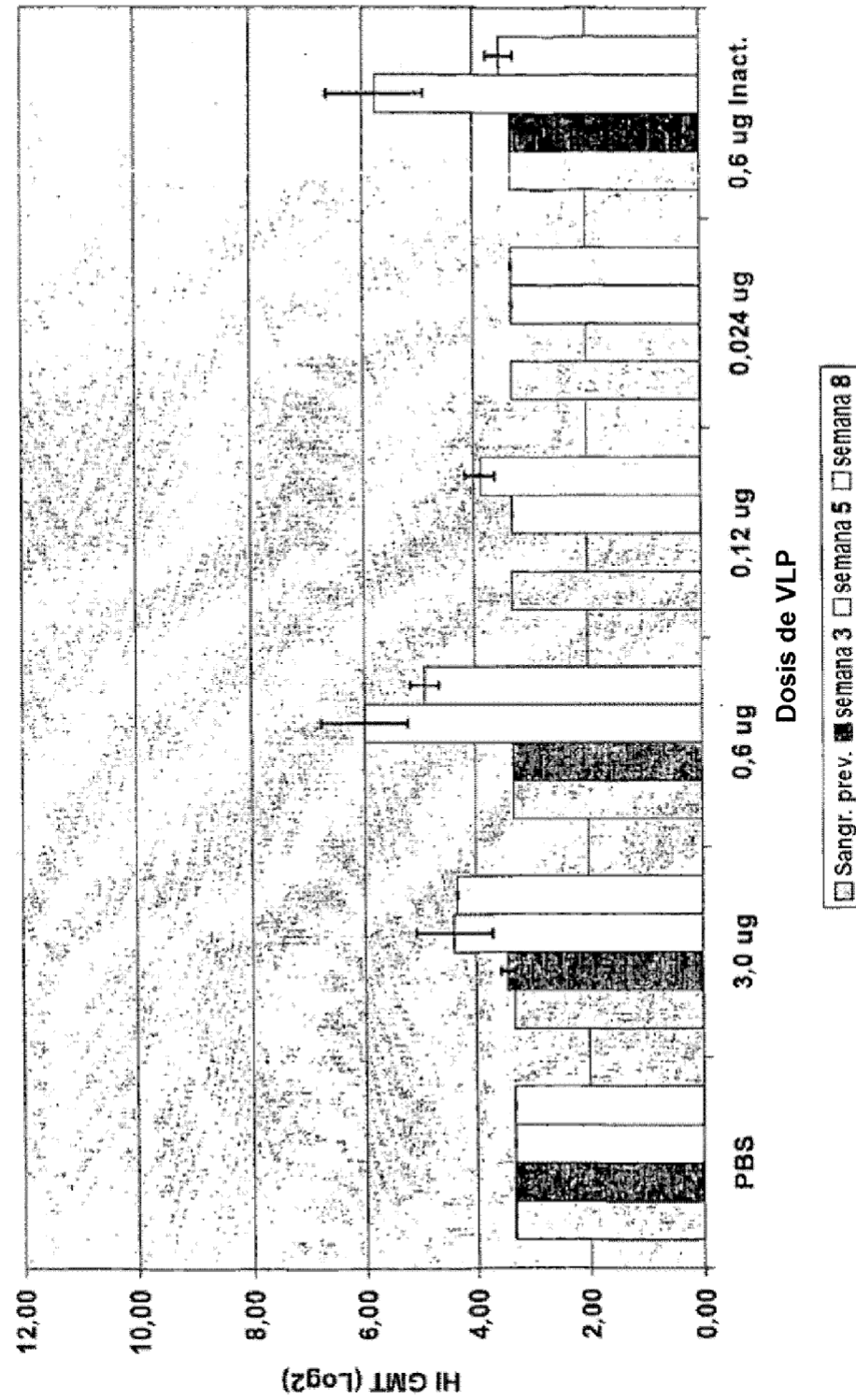


FIGURA 30 G

Título de HI para A/Nueva York/55/2004 (H3N2) tras inoculación intranasal de VLP de H3N2

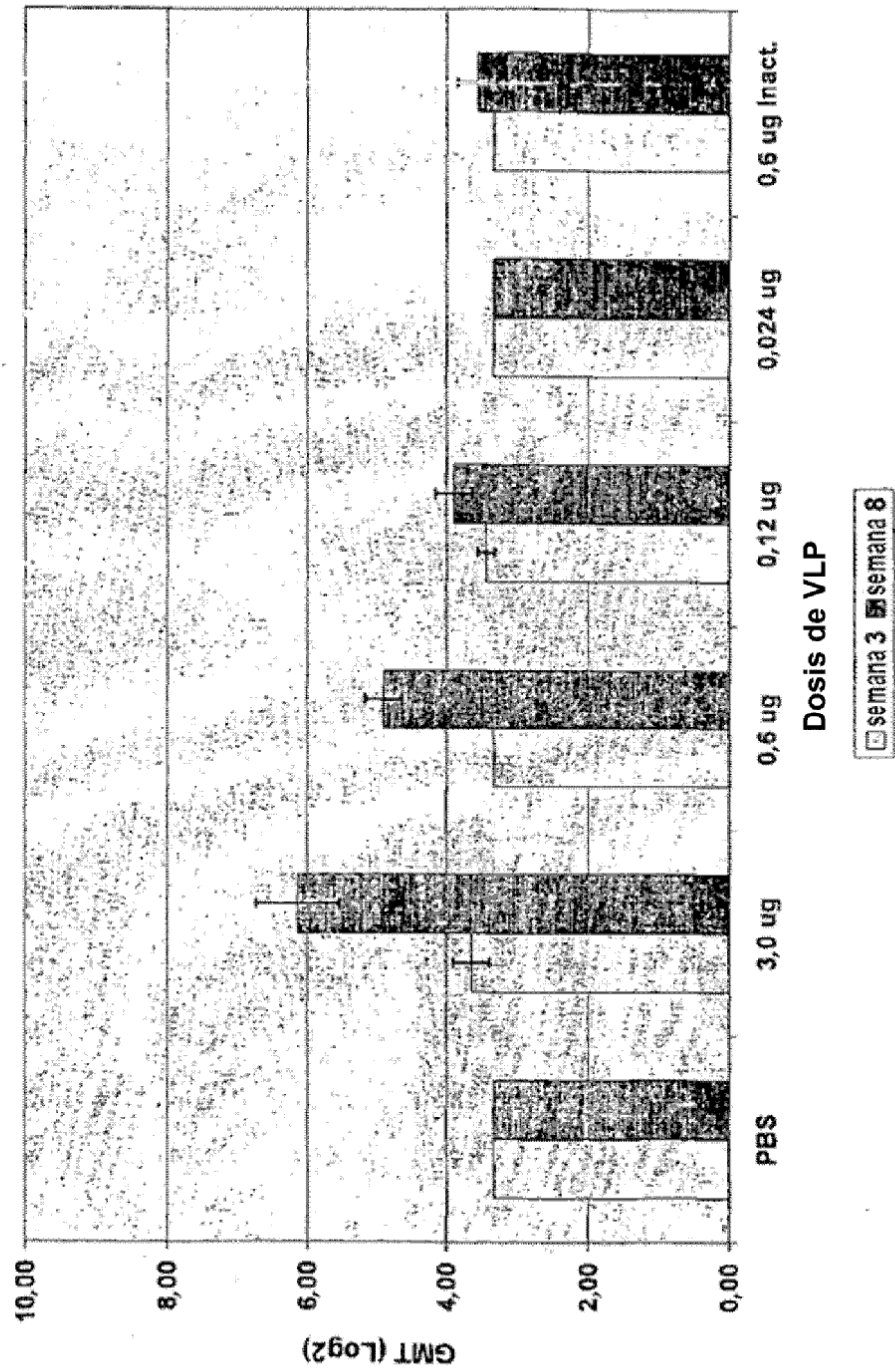


FIGURA 30 H