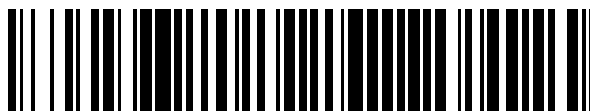


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 007**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005** **E 05750661 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015** **EP 1748790**

54 Título: **Sistema multi-plásmido para la producción de virus de la gripe**

30 Prioridad:

24.05.2004 US 574117 P
12.06.2004 US 578962 P
01.12.2004 US 631892 P
13.01.2005 US 643278 P
02.03.2005 US 657372 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOFFMANN, ERICH;
JIN, HONG;
LU, BIN;
DUKE, GREGORY;
KEMBLE, GEORGE y
CHEN, ZHONGYING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 550 007 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

Sistema multi-plásmido para la producción de virus de la gripe.

5 Antecedentes de la invención

Los virus de la gripe están formados por un núcleo interno de ribonucleoproteína que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envuelta externa de lipoproteína revestida de una proteína de matriz. Los virus de la gripe A y B contiene cada uno ocho segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa. El genoma de gripe A codifica al menos once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican los tres polipéptidos, formando el ARN viral dependiente de ARN polimerasa. El segmento 1 codifica la proteína de complejo de polimerasa PB2. Las demás proteínas polimerasas, PB1 y PA, están codificadas por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de gripe A codifica una proteína pequeña, PB 1-F2, producida a partir de una fase de lectura alternativa en la región codificante de PB 1. El segmento 4 codifica la glucoproteína de superficie hemaglutinina (HA) implicada en la unión y entrada a la célula durante la infección. El segmento 5 codifica el polipéptido de la nucleoproteína de la nucleocápsida (NP), el componente estructural principal asociado con el ARN viral. El segmento 6 codifica una glucoproteína de envuelta, neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica dos proteínas de matriz, denominadas M1 y M2, que se traducen a partir de ARNm cortados y empalmados de manera diferencial. El segmento 8 codifica a NS1 y NS2 (NEP), dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes de ARNm de corte y empalme alternativo.

Los ocho segmentos del genoma de la gripe B codifican 11 proteínas. Los tres genes más grandes codifican componentes de la ARN polimerasa, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica la proteína HA. El segmento 5 codifica a NP. El segmento 6 codifica la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, NB y NA, se traducen a partir de fases de lectura solapantes de un ARNm bicistrónico. El segmento 7 de la gripe B también codifica dos proteínas: M1 y BM2. El segmento más pequeño codifica dos productos: NS1 se traduce a partir del ARN de longitud completa, mientras que NS2 se traduce a partir de una variante de ARNm de corte y empalme.

Se han producido vacunas capaces de producir una respuesta inmunitaria protectora específica para los virus de la gripe durante más de 50 años. Las vacunas pueden caracterizarse como vacunas de virus completo, vacunas de virus fraccionados, vacunas de antígenos de superficie y vacunas de virus vivo atenuado. Mientras que las formulaciones adecuadas de cualquiera de estos tipos de vacuna son capaces de producir una respuesta sistémica inmune, las vacunas de virus vivo atenuado también son capaces de estimular la inmunidad mucosal local en el tracto respiratorio.

FluMist™ es una vacuna viva atenuada que protege a niños y adultos frente a la enfermedad de la gripe (Belshe et al., (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal Influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). Las cepas de la vacuna FluMist™ contienen segmentos génicos de HA y NA procedentes de las cepas de tipo silvestre actualmente en circulación junto con seis segmentos génicos, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, de un virus donante maestro (VDM). El VDM para las cepas de gripe A de FluMist (VDM-A) se creó pasando en serie la cepa de wt (tipo silvestre) A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) en cultivo tisular de riñón primario de pollo a temperaturas sucesivamente más bajas (Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213:612-4). VDM-A se replica de manera eficaz a 25°C (ca, adaptado al frío), pero su crecimiento está restringido a 38 y 39 °C (ts, sensible a la temperatura). Además, el virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (att, atenuación). Se cree que el fenotipo ts contribuye a la atenuación de la vacuna en seres humanos restringiendo su replicación en todas salvo las partes más frías del tracto respiratorio. La estabilidad de esta propiedad se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos. A diferencia del fenotipo ts de cepas de gripe creadas mediante mutagénesis química, la propiedad ts de VDM-A no se revirtió después de su pase por hámsteres infectados o en aislados obtenidos de niños (para una revisión reciente, véase Murphy y Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines Viral Immunol 15:295-323). Mochalova et al. (2003), Virology, 313(2):473-480 divulgan que la propagación del virus H1N1 humano en huevos embrionados da como resultado una selección de variantes con sustituciones de aminoácidos próximas al sitio de unión al receptor de HA, es decir, G226R o D225G. Medeiros et al. (2001), Virology, 289(1):74-85 describen que el cambio sucesivo de Gln226 a Leu a Ile a Val observado en aislados naturales da como resultado una pérdida progresiva de la capacidad de la HA para unirse a los eritrocitos de pollo. Ha et al. (2001), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(20):11181-11186 confirman que Gln226 es un resto específico de aves, mientras que Leu226 es específico de seres humanos. Rogers et al. (1983), Nature, 304(5921):76-78 también identificaron el resto 226 como importante para la unión de HA a ácido siálico en células diana. Este documento sugiere además que también pueden intervenir otros restos en la especificidad, incluyendo His183. Jin-Hua et al. (2004), Virus Genes, 29(3):329-334 desvela que el resto 226, y también los restos 183 y 190 de H9N2 son importantes para la especificidad de unión de HA.

Estudios clínicos en más de 20.000 y niños que implican 12 cepas reorganizantes 6:2 han demostrado que estas vacunas están atenuadas, son seguras y eficaces (Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal Influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338:1405-12; Boyce et al. (2000) Safety and

immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19:217-26; Edwards et al. (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J Infect Dis 169:68-76; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). Los reorganizantes que portan los seis genes internos de VDM-A y los dos segmentos génicos de HA y NA del virus wt (reorganizante 6:2) mantienen los fenotipos ca, ts y att de manera consistente (Maassab et al. (1982) Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets J Infect Dis 146:780-900).

Hasta la fecha, todas las vacunas comerciales para la gripe en los Estados Unidos se han propagado en huevos de gallina embrionados. Aunque el virus de la gripe crece bien en los huevos de gallina, la producción de vacuna depende la disponibilidad de huevos. Deben organizarse los suministros de huevos, y seleccionarse las cepas para vacunación meses antes de la siguiente temporada de gripe, limitando la flexibilidad de esta estrategia, y dando a menudo como resultado retrasos y escasez en la producción y distribución. Desafortunadamente, algunas cepas de vacuna de gripe, tales como el prototipo de cepa A/Fujian/411/02 que circuló durante la temporada 2003-04, no se replica bien en huevos de gallina embrionados, y tiene que aislarse mediante cultivo celular en un procedimiento costoso y laborioso. También se describe en el presente documento una nueva tecnología para aumentar la capacidad de replicación de las cepas de vacuna en huevos de gallina embrionados. Además, la presente divulgación permite una producción más eficaz y económica de vacunas de la gripe.

Los sistemas para producir virus de la gripe en cultivo celular también se han desarrollado en los últimos años (véase, por ejemplo, Furminger. Vaccine Production, en Nicholson et al. (eds) Textbook of Influenza págs. 324-332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen y Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines págs. 141-151). Típicamente, estos métodos implican la infección de células hospedadoras inmortalizadas adecuadas con una cepa seleccionada del virus. Aunque se eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patógenas de gripe crecen bien y pueden producirse de acuerdo con los métodos de cultivo tisular establecidos. Además, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación fría, adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas, no han crecido satisfactoriamente en cultivo tisular usando métodos establecidos.

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

Además, ninguno de los sistemas solo de plásmido actualmente disponibles es adecuado para generar cepas atenuadas, sensibles a la temperatura, adaptadas al frío para la producción de vacunas vivas atenuadas. También se describen en el presente documento un sistema de ocho plásmidos para la generación de virus de la gripe B totalmente a partir de ADNc clonado, y métodos para la producción de virus de la gripe A y B vivos atenuados adecuados para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacuna de virus vivo útiles para administración intranasal, así como otros numerosos beneficios que serán evidente tras una revisión de la memoria descriptiva.

Sumario de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. La presente invención se refiere a un método para aumentar la replicación de un virus de gripe reorganizante, comprendiendo el método las etapas de: i) comparar la secuencia de aminoácidos del virus de la gripe reorganizante con la secuencia de aminoácidos de un virus de gripe diferente, creciendo dicho virus de la gripe diferente en huevos embrionados; ii) alterar uno o más aminoácidos en un polipéptido de HA de H3N2 del virus reorganizante para que coincida con la secuencia del virus de la gripe diferente que comprende sustituir según sea necesario los restos de aminoácidos de H3 de HA siempre que la posición 183 sea una leucina y la posición 226 sea una alanina, produciendo de este modo un virus reorganizante alterado; y iii) crecer el virus reorganizante alterado en huevos, mediante lo que la replicación del virus reorganizante alterado aumenta en al menos un 10% en comparación con la replicación de virus reorganizante no alterado. La presente invención se refiere además a un virus de gripe reorganizante de replicación potenciada que comprende una proteína HA de H3N2 que comprende una leucina en la posición 183 y una alanina en la posición 226 así como a una composición inmunogénica que comprende el virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de la invención. También se describe en el presente documento un sistema multi-vector para la producción de virus de la gripe en cultivo celular, y a métodos para producir virus de la gripe recombinantes y reorganizantes, incluyendo, por ejemplo, virus de la gripe atenuados (att), adaptados al frío (ca) y/o sensibles a la temperatura (ts), adecuados como

vacunas, incluyendo vacunas de la gripe vivas atenuadas, tales como aquellas adecuadas para su administración en una formulación de vacuna intranasal.

También se describen en el presente documento vectores y métodos para producir virus de la gripe B recombinantes en cultivo celular, por ejemplo, en ausencia de virus auxiliar (es decir, un sistema de cultivo celular sin virus auxiliar). Los métodos descritos en el presente documento implican introducir una diversidad de vectores, cada uno de los cuales incorpora una porción de un virus de la gripe B en una población de células hospedadoras capaces de soportar replicación viral. Las células hospedadoras se cultivan en condiciones permisivas para el crecimiento viral, y se recuperan los virus de la gripe. Los virus de la gripe B pueden ser virus atenuados, virus adaptados al frío y/o virus sensibles a la temperatura. Por ejemplo, los virus de la gripe B recombinantes procedentes de vectores son virus atenuados, adaptados al frío, sensibles a la temperatura, de tal forma que son adecuados para su administración como una vacuna atenuada viva, por ejemplo, en una formulación de vacuna intranasal. En un ejemplo, los virus se producen introduciendo una diversidad de vectores que incorporan la totalidad o parte de un genoma de virus de la gripe B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, un genoma de virus ca B/Ann Arbor/1/66.

Por ejemplo, los virus de la gripe B son virus de la gripe diseñados por ingeniería genética de manera artificial que incorporan una o más sustituciones de aminoácidos que influyen las propiedades biológicas características de la cepa ca de gripe B/Ann Arbor/1/66. Dichos virus de la gripe incluyen modificaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, tales como: PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G). Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que de manera individual o en combinación de como resultado un aumento en la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío o la atenuación en relación a virus de tipo silvestre es una mutación adecuada en el contexto descrito en el presente documento.

Puede introducirse en una población de células hospedadoras una diversidad de vectores que incorporan al menos los 6 segmentos genómicos internos de una cepa de gripe B junto con uno o más segmentos génicos que codifican antígenos de superficie inmunogénicos de la gripe de una cepa de gripe diferente. Por ejemplo, Se introducen al menos los 6 segmentos genómicos internos de una cepa de gripe B atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, una cepa ca, att, ts de B/Ann Arbor/1/66 o una cepa de gripe B diseñada por ingeniería genética de manera artificial que incluye una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones especificadas anteriormente, en una población de células hospedadoras junto con uno o más segmentos que codifican antígenos inmunogénicos procedentes de otra cepa de virus. Típicamente, los antígenos de superficie inmunogénicos incluyen uno o ambos de los antígenos de hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). En los casos donde se introduce un solo segmento que codifica un antígeno de superficie inmunogénico, también se introducen los 7 segmentos complementarios del virus seleccionado en las células hospedadoras.

Pueden introducirse una variedad de vectores plasmídicos que incorporan segmentos del genoma del virus de la gripe B en una población de células hospedadoras. Por ejemplo, se utilizan 8 plásmidos, cada uno de los cuales incorpora un segmento de genoma diferente, para introducir un genoma de gripe B completo en las células hospedadoras. Como alternativa, puede emplearse un número mayor de plásmidos, que incorporan subsecuencias genómicas más pequeñas.

Típicamente, los vectores plasmídicos descritos en el presente documento son vectores de expresión bidireccionales. Un vector de expresión bidireccional descrito en el presente documento incluye típicamente un primer promotor y un segundo promotor, en el que el primer y el segundo promotor están unidos operativamente a hebras alternas del mismo ADNc bicatenario que codifica el ácido nucleico viral, incluyendo un segmento del genoma viral de la gripe. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o una secuencia de terminación. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia de terminación pueden estar localizadas flanqueando a un segmento del genoma del virus de la gripe interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable en el contexto descrito en el presente documento es la señal de poliadenilación de SV40. Un vector plasmídico ejemplar descrito en el presente documento es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

Los vectores se introducen en células hospedadoras capaces de soportar la replicación del virus de la gripe a partir de los promotores del vector. Los ejemplos favorables de células hospedadoras incluyen células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS. En combinación con los vectores plasmídicos pAD3000 descritos en el presente documento las células Vero, células 293, y células COS son particularmente adecuadas. Los co-cultivos de una mezcla de al menos dos de estas líneas celulares, por ejemplo, una combinación de células COS y MDCK o una combinación de células 293T y MDCK, puede constituir la población de células hospedadoras.

Entonces se crecen las células hospedadoras que incluyen los vectores de gripe B en cultivo en condiciones permisivas para la replicación y ensamblaje de virus. Típicamente, las células hospedadoras que incorporan los plásmidos de gripe B descritos en el presente documento se cultivan a una temperatura por debajo de 37 °C, preferentemente a una temperatura igual a, o menor de, 35 °C. Típicamente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32 °C y 35 °C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 34 °C, por ejemplo, a aproximadamente 33 °C. Después del cultivo durante un periodo de tiempo adecuado para

permitir la replicación del virus hasta un título elevado, se recuperan los virus recombinantes y/o reorganizantes. Opcionalmente, pueden inactivarse los virus recuperados.

También se describen en el presente documento métodos ampliamente aplicables para producir virus de gripe recombinantes en cultivo celular mediante la introducción de una diversidad de vectores que incorporan un genoma de virus de la gripe en una población de células hospedadoras capaces de soportar la replicación de virus de la gripe, el cultivo de las células a una temperatura menor o igual a 35 °C, y la recuperación de los virus de la gripe.

Puede introducirse una variedad de vectores plasmídicos que incorporan segmentos del genoma del virus de la gripe en una población de células hospedadoras. Pueden utilizarse 8 plásmidos, incorporando cada uno un segmento genómico diferente para introducir un genoma de gripe completo en las células hospedadoras. Típicamente, los vectores plasmídicos descritos en el presente documento son vectores de expresión bidireccionales. Un vector plasmídico ejemplar descrito en el presente documento es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

Los virus de la gripe pueden corresponder a un virus de la gripe B. Los virus de la gripe también pueden corresponder a un virus de la gripe A. Los métodos pueden incluir recuperar virus de la gripe recombinantes y/o reagrupados capaces de provocar una respuesta inmune tras su administración, por ejemplo, administración intranasal, a un sujeto. Los virus pueden inactivarse antes de su administración, o pueden administrarse virus vivos atenuados. También se describen en el presente documento virus de la gripe A y de la gripe B recombinantes y reorganizantes producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Los virus pueden incluir un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas características deseables. El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, una cepa B/Ann Arbor/1/66 adaptada al frío, sensible a la temperatura y atenuada. El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60, por ejemplo, una cepa A/Ann Arbor/6/60 adaptada al frío, sensible a la temperatura y atenuada. Los virus pueden ser virus de la gripe diseñados por ingeniería genética de manera artificial que incorporan uno o más aminoácidos sustituidos que influyen las propiedades biológicas características de por ejemplo, ca A/Ann Arbor/6/60 o ca B/Ann Arbor/1/66. Dichos aminoácidos sustituidos corresponden de manera favorable a aminoácidos únicos de ca A/Ann Arbor/6/60 o ca B/Ann Arbor/1/66, por ejemplo, en un virus de cepa A: PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y, en un virus de cepa B: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (p410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). De manera similar, están abarcadas otras sustituciones en cualquiera de estas posiciones que den como resultado sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación por los virus y métodos descritos en el presente documento. Se entenderá que algunos virus A o B pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas.

Opcionalmente, se producen virus reorganizantes introduciendo vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa viral seleccionada respecto de sus propiedades favorables en relación a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos genómicos que codifican los antígenos de superficie (HA y NA) de una cepa seleccionada, por ejemplo, patogénica. Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B patogénicamente relevante, tal como se efectúa rutinariamente para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento NA puede seleccionarse de una cepa patogénica emergente, tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). Como alternativa, se introducen los siete segmentos génicos complementarios de la primera cepa en combinación con el segmento que codifica a HA o a NA. Los segmentos génicos internos pueden proceder de las cepas de gripe B/Ann Arbor/1/66 o A/Ann Arbor/6/60.

También se describen en el presente documento métodos para producir nuevos virus de la gripe con propiedades deseables relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, virus de la gripe sensibles a la temperatura, atenuados y/o adaptados al frío, así como vacunas para la gripe que incluyen dichos nuevos virus de la gripe. Los nuevos virus de gripe de cepa A pueden producirse introduciendo mutaciones que den como resultado sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones especificadas que se demuestra en el presente documento que son importantes para el fenotipo sensible a la temperatura, por ejemplo, PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴. Por ejemplo, se introducen mutaciones en las posiciones de nucleótido PBS¹¹⁹⁵, PB1¹⁷⁶⁶, PB1²⁰⁰⁵, PB2⁸²¹ y NP¹⁴⁶, u otras posiciones de nucleótidos, dando como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido especificada. Cualquier mutación (en una o más de estas posiciones) que de manera individual o en combinación de como resultado un aumento en la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío o la atenuación en relación a virus de tipo silvestre es una mutación adecuada en el contexto descrito en el presente documento. Por ejemplo, las mutaciones seleccionadas entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G) se introducen favorablemente en el genoma de una cepa de gripe A de tipo silvestre, por ejemplo, PR8, para producir una variante sensible a la temperatura adecuada para su administración como vacuna viva atenuada. Para aumentar la estabilidad del fenotipo deseado, se introduce típicamente una diversidad de mutaciones. Después de la introducción de las mutaciones seleccionadas en el genoma de la gripe, el genoma de la gripe mutado se replica en condiciones en las que se produce el virus. Por ejemplo, el genoma del virus de la gripe mutado puede replicarse en

huevos de gallina. Como alternativa, el genoma del virus de la gripe puede replicarse en cultivo celular. En el último caso, el virus se amplifica además opcionalmente en huevos de gallina para aumentar el título. También se describen en el presente documento virus sensibles a la temperatura y opcionalmente atenuados y/o adaptados al frío producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, así como vacunas que incluyen dichos virus. De manera similar, también se describen en el presente documento nuevos ácidos nucleicos virales recombinantes que incorporan una o más mutaciones en las posiciones PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, por ejemplo, las mutaciones seleccionadas entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G), y polipéptidos con dichas sustituciones de aminoácidos.

Del mismo modo, los métodos presentados en el presente documento están adaptados para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura, y opcionalmente atenuados y/o adaptados al frío mediante la introducción de una o más mutaciones especificadas en un genoma de gripe B. Por ejemplo, se introducen una o más mutaciones que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³ en el genoma de una cepa de gripe B para producir un virus de la gripe B sensible a la temperatura. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen las siguientes: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). Tal como se indica anteriormente, también se describen en el presente documento todas las vacunas que incorporan dichos virus así como los ácidos nucleicos y polipéptidos que incorporan estas mutaciones y sustituciones de aminoácidos. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados que comprenden o como alternativa consisten en introducir las siguientes sustituciones de aminoácidos: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). Se contempla específicamente que se encuentren dentro del ámbito descrito en el presente documento sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas en estas posiciones. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados que comprenden o como alternativa consisten en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácidos: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados que comprenden o como alternativa consisten en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácidos: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, y M1¹⁸³. Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados que comprenden o como alternativa consisten en introducir las siguientes sustituciones de aminoácidos: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); M1¹⁵⁹ (H159Q), M1¹⁸³ (M183V); y PA⁴⁹⁷ (Y497H). Los métodos presentados en el presente documento pueden adaptarse para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados que comprenden o como alternativa consisten en introducir las siguientes sustituciones de aminoácidos: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); (M1¹⁵⁹ (H159Q) y/o M1¹⁸³ (M183V)); y PA⁴⁹⁷ (Y497H). Se contempla específicamente que se encuentren dentro del ámbito descrito en el presente documento sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas en estas posiciones. Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas. Los métodos presentados en el presente documento también pueden adaptarse para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados que comprenden o como alternativa consisten en introducir una mutación en las siguientes posiciones de aminoácidos: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, M1¹⁵⁹, M1¹⁸³, y PA⁴⁹⁷.

Por consiguiente, también se describen en el presente documento virus de la gripe que incorporan las mutaciones descritas en el presente documento independientemente del método mediante el cual se produzcan. Es decir, también se describen en el presente documento cepas de gripe que incluyen las mutaciones descritas en el presente documento, por ejemplo, cualquier virus de gripe A con una sustitución de aminoácidos en relación al tipo silvestre en una o más posiciones seleccionadas entre: PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ o cualquier virus de gripe B con una sustitución de aminoácidos en relación al tipo silvestre en una o más posiciones seleccionadas entre: PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³, con la salvedad de no considerar como descritas en el presente documento las cepas ca A/Ann Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66. Los virus de gripe A pueden incluir una diversidad de mutaciones seleccionadas entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y los virus de gripe B pueden incluir una diversidad de mutaciones seleccionadas entre PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V), respectivamente. Se entenderá que algunos virus A pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado también pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); y M1¹⁵⁹ (H159Q). Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado igualmente pueden comprender o como

alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); y M1¹⁸³ (M183V). Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas. Se contempla específicamente que estén también descritas en el presente documento sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas en estas posiciones. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, y M1¹⁵⁹. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, y M1¹⁸³. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); M1¹⁵⁹ (H159Q), M1¹⁸³ (M183V); y PA⁴⁹⁷ (Y497H). Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas. Las nuevas cepas B con fenotipo sensible a la temperatura y atenuado pueden comprender o como alternativa consistir en sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, M1¹⁵⁹, M1¹⁸³, y PA⁴⁹⁷. Se entenderá que algunos virus B pueden tener ya los restos citados en las posiciones indicadas. En este caso, las sustituciones se efectuarán de tal forma que el virus resultante tenga todas las sustituciones preferidas.

Puede introducirse una diversidad de vectores plasmídicos que incorporan el genoma del virus de la gripe en las células hospedadoras. Por ejemplo, pueden incorporarse los segmentos de un genoma de virus de la gripe en al menos 8 vectores plasmídicos. Los segmentos de un genoma de virus de la gripe pueden incorporarse en 8 plásmidos. Por ejemplo, cada uno de los 8 plásmidos puede incorporar favorablemente un segmento diferente del genoma del virus de la gripe.

Los vectores descritos en el presente documento pueden ser vectores de expresión bidireccionales. Un vector de expresión bidireccional descrito en el presente documento incluye típicamente un primer promotor y un segundo promotor, en el que el primer y el segundo promotor están unidos operativamente a hebras alternas del mismo ácido nucleico viral bicatenario que incluye un segmento del genoma viral de la gripe. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional incluye una señal de poliadenilación y/o una secuencia de terminación. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia de terminación pueden estar localizadas flanqueando a un segmento del genoma del virus de la gripe interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable en el contexto descrito en el presente documento es la señal de poliadenilación de SV40. Un vector plasmídico ejemplar descrito en el presente documento es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

Cualquier célula hospedadora capaz de soportar la replicación del virus de la gripe a partir de los promotores del vector es adecuada en el contexto descrito en el presente documento. Los ejemplos favorables de células hospedadoras incluyen células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS. En combinación con los vectores plasmídicos pAD3000 descritos en el presente documento las células Vero, células 293, y células COS son particularmente adecuadas. Los co-cultivos de una mezcla de al menos dos de estas líneas celulares, por ejemplo, una combinación de células COS y MDCK o una combinación de células 293T y MDCK, puede constituir la población de células hospedadoras.

También se describe en el presente documento el cultivo de células hospedadoras que incorporan los plásmidos descritos en el presente documento a una temperatura por debajo de 37 °C, preferentemente a una temperatura igual a, o menor de, 35 °C. Típicamente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32 °C y 35 °C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 34 °C, por ejemplo, a aproximadamente 33 °C.

En el presente documento también se describen nuevos métodos para rectar virus de la gripe A o de la gripe B recombinantes o reorganizantes (es decir, cepas de tipo silvestre y variantes de la gripe A y/o virus de la gripe) a partir de células Vero en cultivo. Se electropora una diversidad de vectores que incorporan un genoma de virus de la gripe en una población de células Vero. Las células se crecen en condiciones permisivas para la replicación viral, por ejemplo, en el caso de cepas del virus adaptadas al frío, atenuadas y sensibles a la temperatura, se hacen crecer las células Vero a una temperatura por debajo de 37 °C, preferentemente a una temperatura igual a, o menor de, 35 °C. Típicamente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32 °C y 35 °C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 34 °C, por ejemplo, a aproximadamente 33 °C. Opcionalmente (por ejemplo, para la producción de vacunas), se hace crecer las células Vero en medio libre de suero sin productos de origen animal.

En los métodos descritos anteriormente, los virus se recuperan después de cultivar las células hospedadoras que incorporan los plásmidos del genoma de la gripe. Los virus recuperados pueden ser virus recombinantes. Los virus pueden ser virus de la gripe reorganizantes que tienen contribuciones genéticas de más de una cepa de virus progenitora. Opcionalmente, los virus recombinantes o reagrupados recuperados se amplifican adicionalmente mediante paso por cultivos celulares o en huevos de gallina.

Opcionalmente, los virus recuperados están inactivados. Los virus recuperados pueden comprender una vacuna para la gripe. Por ejemplo, la vacuna para la gripe recuperada puede ser un virus de la gripe reorganizante (por ejemplo, virus reorganizantes 6:2 o 7:1) que tienen un antígeno de HA y/o de NA procedente de una cepa seleccionada de gripe A o gripe B. Los virus de la gripe reorganizantes pueden tener un fenotipo atenuado. Opcionalmente, los virus de la gripe reorganizantes pueden estar adaptados al frío y/o ser sensibles a la temperatura, por ejemplo, un virus de la gripe b atenuado, adaptado al frío o sensible a la temperatura que tenga una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre las sustituciones de la Tabla 17. Dichos virus de la gripe son útiles, por ejemplo, como vacunas vivas atenuadas para la producción profiláctica de una respuesta inmunitaria específica para una cepa de gripe seleccionada, por ejemplo, patógena. También se describen en el presente documento virus de la gripe, por ejemplo, virus de la gripe reorganizantes, producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

También se describen en el presente documento métodos para producir una vacunas de virus de gripe recombinante que implica introducir una diversidad de vectores que incorporan un genoma de virus de la gripe en una población de células hospedadoras capaces de soportar la replicación del virus de la gripe, cultivar las células hospedadoras a una temperatura menor o igual a 35 °C, y recuperar un virus de la gripe capaz de provocar una respuesta inmunitaria tras su administración al sujeto. Las vacunas descritas en el presente documento pueden ser virus de cepas de gripe A o gripe B. Los virus de la vacuna de la gripe pueden incluir un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, o un virus de la gripe sensible a la temperatura. Los virus pueden poseer una combinación de estas propiedades deseables. El virus de la gripe puede contener un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60, El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66. Como alternativa, la vacuna incluye virus de la gripe A o de la gripe B diseñados por ingeniería genética de manera artificial por ingeniería genética que incorporan al menos un aminoácido sustituido que influencia las propiedades biológicas características de ca A/Ann Arbor/6/60 o ca/B/Ann Arbor/1/66, tal como un único aminoácido de estas cepas. Por ejemplo, las vacunas descritas en el presente documento incluyen virus de la gripe A recombinantes y reorganizantes que incluyen al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ y virus de gripe B recombinantes y reorganizantes diseñados por ingeniería genética de manera artificial que incluyen al menos una mutación que dé como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³.

El virus puede incluir un virus de la gripe reorganizante (por ejemplo, un reorganizante 6:2 o 7:1) que tiene segmentos de genoma viral procedentes de más de una cepa de virus de la gripe. Por ejemplo, una vacuna d virus de gripe reorganizante incluye favorablemente un antígeno de superficie de HA y/o NA procedente de una cepa seleccionada de gripe A o B, en combinación con los segmentos de genoma internos de una cepa de virus seleccionada por sus propiedades deseables respecto de la producción de vacunas. A menudo, es deseable seleccionar la cepa de gripe de la que proceden los segmentos que codifican a HA y/o NA basándose en predicciones de prevalencia local o mundial de cepas patógenas (por ejemplo, tal como se describe anteriormente). En algunos casos, la cepa de virus que contribuye a los segmentos de genoma internos es una cepa de gripe atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, de cepa A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, o una cepa de gripe diseñada por ingeniería genética de manera artificial que tenga una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado el fenotipo deseado, por ejemplo, virus de gripe A que incluyen al menos una mutación que dé como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ y virus de gripe B que incluyen al menos una mutación que dé como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³. Por ejemplo, los virus reorganizantes favorables incluyen virus de gripe A diseñados por ingeniería genética de manera artificial con una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y virus de gripe B que incluyen una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre PB2⁶³⁰ (S630R), PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V).

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

También se describen en el presente documento vacunas de virus de la gripe, incluyendo vacunas vivas atenuadas, producidas mediante los métodos descritos en el presente documento. Las vacunas de virus de la gripe pueden ser vacunas de virus reorganizantes.

También se describen en el presente documento plásmidos que son vectores de expresión bidireccionales. Los vectores de expresión bidireccionales descritos en el presente documento incorporan un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación, por ejemplo, un sitio de poliadenilación de SV40. El primer promotor y el segundo promotor pueden situarse en orientaciones opuestas flanqueando a al menos un sitio de clonación. Un vector ejemplar descrito en el presente documento es el plásmido pAD3000, ilustrado en la Figura 1.

Puede insertarse al menos un segmento de un genoma de virus de la gripe en el sitio de clonación, por ejemplo, en forma de un ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, un vector descrito en el presente documento incluye un plásmido que tiene un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación de SV40,

en el que el primer promotor y el segundo promotor están situados en orientaciones opuestas flanqueando al menos un segmento de un virus de la gripe.

También se describen en el presente documento kits que incluyen uno o más vectores de expresión descritos en el presente documento. Típicamente, los kits también incluyen uno o más de: una línea celular capaz de soportar la replicación del virus de la gripe, un tampón, un medio de cultivo, un conjunto de instrucciones, un material de envase y un recipiente. El kit puede comprender una diversidad de vectores de expresión, pudiendo incluir cada uno de ellos al menos un segmento de un genoma de virus de la gripe. Por ejemplo, también se describen en el presente documento kits que incluyen una diversidad de vectores de expresión incluyendo cada uno los segmentos de genoma internos de una cepa de virus seleccionada, por ejemplo, seleccionada por sus propiedades deseables respecto de la producción o administración de vacunas. Por ejemplo, la cepa de virus seleccionada puede ser una cepa atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66, o una cepa alternativa con las propiedades deseadas, tal como una cepa diseñada artificialmente que tenga una o más sustituciones de aminoácidos tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 17. El kit puede incluir vectores de expresión que incorporan miembros de una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican variantes de antígenos de HA y/o NA.

También se describe en el presente documento el crecimiento productivo de cultivos celulares que incluyen al menos una célula que incorpora una diversidad de vectores que incluyen un genoma de virus de la gripe, a una temperatura menor o igual a 35 °C. La composición también puede incluir un medio de cultivo celular. La diversidad de vectores puede incluir vectores de expresión bidireccionales, por ejemplo, que comprenden un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación de SV40. Por ejemplo, el primer promotor y el segundo promotor pueden situarse en orientaciones opuestas flanqueando a al menos un segmento de un virus de la gripe. Los cultivos celulares descritos en el presente documento se mantienen a una temperatura menor o igual a 35 °C, tal como entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, típicamente entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, por ejemplo, a aproximadamente 33 °C.

También se describe en el presente documento un sistema de cultivo celular que incluye un cultivo celular de crecimiento productivo de al menos una célula que incorpora una diversidad de vectores que comprenden un genoma de virus de gripe, tal como se describe anteriormente, y un regulador para mantener el cultivo a una temperatura menor o igual a 35 °C. Por ejemplo, el regulador mantiene favorablemente al cultivo celular a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, típicamente entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, por ejemplo, a aproximadamente 33 °C.

También se describen en el presente documento virus de la gripe recombinantes o reorganizantes diseñados por ingeniería genética de manera artificial que incluyen una o más sustituciones de aminoácidos que influyen la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío y/o la atenuación. Por ejemplo, también se describen en el presente documento virus de la gripe A que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ y virus de gripe B diseñados por ingeniería genética de manera artificial que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³. Los ejemplos incluyen virus de gripe A con una cualquiera o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y virus de la gripe B con una cualquiera o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). Los virus pueden incluir una diversidad de mutaciones, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve sustituciones de aminoácidos en las posiciones identificadas anteriormente. Por consiguiente, también se describen en el presente documento virus de la gripe A que tienen sustituciones de aminoácidos en todas las cinco posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G) y virus de gripe B diseñados por ingeniería genética de manera artificial que tienen sustituciones de aminoácidos en ocho o en todas las nueve posiciones indicadas anteriormente, por ejemplo, PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V). Además, los virus pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos adicionales no enumeradas anteriormente. Además, se describen en el presente documento virus de gripe A o B que tienen sustituciones de aminoácidos en las siguientes cinco posiciones: PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³. Además, los virus pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos adicionales no enumeradas anteriormente.

Los virus de la gripe diseñados por ingeniería genética de manera artificial pueden ser virus de la gripe sensibles a la temperatura, virus de la gripe adaptados al frío y/o virus de la gripe atenuados. Por ejemplo, un virus de la gripe sensible a la temperatura muestra típicamente una reducción log₁₀ del crecimiento de aproximadamente 2,0 y 5,0 a 39 °C en comparación con un virus de la gripe de tipo silvestre. Por ejemplo, un virus sensible a la temperatura muestra favorablemente una reducción del crecimiento de al menos aproximadamente 2,0 log₁₀, al menos aproximadamente 3,0 log₁₀, al menos aproximadamente 4,0 log₁₀, o de al menos aproximadamente 4,5 log₁₀ a 39 °C en relación a la de un virus de la gripe de tipo silvestre. Típicamente, pero no necesariamente, un virus de la gripe sensible a la temperatura mantiene características de crecimiento robusto a 33 °C. Un virus de la gripe atenuado descrito en el presente documento muestra típicamente una reducción en el crecimiento entre 2,0 y 5,0 log₁₀ en un ensayo de atenuación en hurones en comparación con un virus de la gripe de tipo silvestre. Por ejemplo, un virus de

la gripe atenuado descrito en el presente documento muestra una reducción en el crecimiento de al menos aproximadamente 2,0 log₁₀, frecuentemente de aproximadamente 3,0 log₁₀ y favorablemente de al menos aproximadamente 4,0 log₁₀ en un ensayo de atenuación en hurones en relación a virus de la gripe de tipo silvestre.

También se describe en el presente documento un método para producir virus de la gripe en cultivo celular, comprendiendo el método: i) introducir una diversidad de vectores que comprenden un genoma de virus de la gripe en una población de células hospedadoras, siendo capaz dicha población de células hospedadoras de soportar la replicación de virus de la gripe; ii) cultivar la población de células hospedadoras a una temperatura menor o igual a 35 °C; y, iii) recuperar una diversidad de virus de la gripe.

Los métodos anteriores descritos en el presente documento comprenden introducir una diversidad de vectores que comprenden al menos un virus de gripe B/Ann Arbor/1/66 o un genoma de virus de gripe B diseñado por ingeniería genética de manera artificial que codifica al menos un aminoácido sustituido, influenciando dicho aminoácido sustituido las propiedades biológicas características de B/Ann Arbor/1/66.

Los métodos anteriormente descritos pueden comprender introducir una diversidad de vectores en una población de células hospedadoras que comprenden al menos un virus de gripe B/Ann Arbor/1/66 o un genoma de virus de gripe B diseñado por ingeniería genética de manera artificial que codifica al menos un aminoácido sustituido en las siguientes posiciones: PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, y NP⁵⁰⁹. El genoma del virus de cepa B de gripe puede comprender además un aminoácido sustituido en una o más de las siguientes posiciones: M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³.

Los métodos anteriormente descritos pueden comprender introducir una diversidad de vectores en una población de células hospedadoras que comprenden al menos un virus de gripe B/Ann Arbor/1/66 o un genoma de virus de gripe B diseñado por ingeniería genética de manera artificial, en el que el genoma codifica una o más de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre grupo que consiste en: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); y NP⁵⁰⁹ (A509T). El genoma de virus de cepa de gripe B puede comprender al menos cinco sustituciones de aminoácidos.

Se proporciona un método producir un virus de la gripe adaptado al frío (ca), comprendiendo el método: (a) introducir al menos una mutación en las siguientes posiciones de aminoácidos: PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, y NP⁵⁰⁹ en un genoma de virus de gripe B; y (b) replicar el genoma de virus de la gripe mutado en condiciones en las que se produce virus.

También se describe en el presente documento un método para producir un virus de la gripe adaptado al frío (ca), comprendiendo el método: (a) introducir al menos las siguientes mutaciones: PB2⁶³⁰ (S630R), PA⁴³¹ (V431M), NP¹¹⁴ (V114A), NP⁴¹⁰ (P410H), y NP⁵⁰⁹ (A509T) en un genoma de virus de gripe B; y (b) replicar el genoma de virus de la gripe mutado en condiciones en las que se produce virus.

También se describe en el presente documento un método para producir un virus de la gripe adaptado al frío (ca) que se replica eficazmente a 25°C, comprendiendo el método: (a) introducir al menos una mutación en las siguientes posiciones de aminoácidos: PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, y NP⁵⁰⁹ en un genoma de virus de gripe B; y (b) replicar el genoma de virus de la gripe mutado en condiciones en las que se produce virus.

También se describe en el presente documento un método para producir un virus de la gripe adaptado al frío (ca) que se replica eficazmente a 25°C, comprendiendo el método: (a) introducir al menos las siguientes mutaciones: PB2⁶³⁰ (S630R), PA⁴³¹ (V431M), NP¹¹⁴ (V114A), NP⁴¹⁰ (P410H), y NP⁵⁰⁹ (A509T) en un genoma de virus de gripe B; y (b) replicar el genoma de virus de la gripe mutado en condiciones en las que se produce virus.

También se describe en el presente documento un virus de la gripe (y composiciones inmunogénicas que comprenden al mismo) producido mediante los métodos anteriores.

También se describe en el presente documento un virus adaptado al frío (y composiciones inmunogénicas que comprenden al mismo) producido mediante los métodos anteriores.

También se describe en el presente documento la identificación y manipulación de restos de aminoácidos en HA y NA que afectan a la replicación del virus de la gripe en células y en huevos de gallina embrionados. También se describe en el presente documento el uso de tecnología genética inversa para generar vacunas de virus de gripe con HA y NA variantes con replicación mejorada en huevos de gallina embrionados y/o células. También se describen en el presente documento métodos para modular la actividad de unión a receptor de HA y/o la actividad de NA. Además, en el presente documento se describen virus de la gripe con capacidad potenciada para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o células.

También se describen en el presente documento métodos para manipular restos de aminoácidos de HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus de la gripe para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o células. El método implica la introducción de sustituciones de restos de aminoácidos en HA y/o NA y hace uso de métodos para producir virus de la gripe en cultivo celular mediante la introducción de una diversidad de vectores que incorporan un genoma de virus de gripe en una población de células hospedadoras capaces de soportar la replicación del virus de

la gripe, cultivar las células y recuperar el virus de la gripe. Preferentemente, el virus de la gripe recuperado tiene una capacidad aumentada para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o células. También se describen en el presente documento variantes de virus de la gripe con una capacidad aumentada para replicarse en huevos de gallina embrionados (citadas en el presente documento como "variantes de gripe de replicación potenciada") en comparación con cepas virales de gripe no modificadas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ilustración del plásmido pAD3000 (SEC ID N°: 90).

Figura 2: Micrografías de células infectadas.

Figura 3: Análisis de genotipado de rVDM-A y del virus reorganizante 6:2 H1N1 a partir de transfección de plásmido.

Figura 4: Ilustración del sistema de ocho plásmidos para la producción de virus de la gripe B.

Figura 5: A y B. Caracterización del virus VDM-B recombinante mediante RT-PCR; C y D. Caracterización de B/Yamanashi/166/98 mediante RT-PCR.

Figura 6: Secuencia de pAD3000 en formato de GeneBank.

Figura 7: Alineamiento de secuencia con VDM-B y ocho plásmidos (SEC ID N°: 91-98).

Figura 8: Productos de RT-PCR procedentes de la amplificación simultánea de segmentos de HA y NA de cepas de gripe B.

Figura 9: Diagrama de barras que ilustra los títulos relativos de virus recombinantes y reorganizantes.

Figura 10: Diagrama de barras que ilustra los títulos relativos de virus reorganizantes a temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura).

Figura 11: Representación gráfica de virus reorganizantes que incorporan mutaciones específicas (*knock-in*) que se correlacionan con la sensibilidad a la temperatura (panel izquierdo) y los títulos relativos a temperaturas permisivas y restrictivas (sensibilidad a la temperatura) (panel derecho).

Figura 12: Determinación de mutaciones de ts en un ensayo de minigenoma. A. Se transfectaron células HEP-2 con PB1, PB2, PA, NP y pFlu-CAT, se incubaron a 33 o 39 °C durante 18 horas y se analizaron los extractos celulares respecto de la expresión de gen indicador de CAT. B. Expresión de ARNm de CAT mediante ensayo de extensión de cebadores.

Figura 13: Ilustración esquemática de recombinantes de genoma triple con restos de tipo silvestre en las proteínas PA, NP, y M1.

Figura 14: Tabulación del crecimiento de virus recombinantes de un solo gen y de doble gen.

Figura 15: Tabulación de restos de aminoácidos de la nucleoproteína que corresponde a fenotipo no-ts.

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

Figura 17: Diagrama de barras que ilustra los títulos relativos a 33 °C y 39 °C.

Figura 18: Fotomicrografías que ilustran la morfología de la placa de mutantes de PR8 a varias temperaturas. Se infectaron células MDCK tal como se indica y se incubaron a 33, 37 y 39 °C durante tres días. Las placas de virus se visualizaron mediante inmunotinción y se fotografiaron.

Figura 19: Síntesis de proteínas a temperaturas permisivas y no permisivas. Se infectaron células MDCK con virus tal como se indica y se incubaron a 33 o 39 °C durante toda la noche. Se electroforesizaron polipéptidos radiomarcados en una SDS-PAGE y se autorradiografiaron. Se indican las proteínas virales HA, NP, M1 y NS.

Figura 20: A. Diagramas de líneas que ilustran la replicación diferencial de VDM-A y VDM-B en células Per.C6 en relación a la replicación en células MDCK; B. Diagrama de líneas que ilustra la replicación diferencial de los reorganizantes de un solo gen de VDM-A en células Per.C6.

Figura 21: Diagrama de barras que ilustra la replicación diferencial de virus reorganizantes. Los recuadros en gris representan restos de aminoácidos de tipo silvestre. Las líneas de puntos representan la temperatura de apagamiento (ts) de 2,0 log₁₀.

5 Figuras 22-23: Comparación antigénica de A/Panama/99 (H3N2) y similar a A/Fujian/411/02 (H3N2).

Figuras 24-28: Muestra la deriva antigénica desde A/Panama/99 a similar a A/Fujian/02.

10 Figuras 29-35: Detalle de las modificaciones en las cepas para producir virus de crecimiento aumentado en huevos embrionados.

Figura 36: Afinidad de unión a receptor de HA de virus recombinantes. Las variantes 6:2 A/Fujian, A/Sendai, A/Wyoming, y A/Fujian con los cambios V186 y 1226 o L183 y A226 se adsorbieron a células MDCK a una mdi de 1,0 a 4°C o 33°C durante 30 min, y las células infectadas se lavaron tres veces (+) o se dejaron sin tratar (-). Después de 6 horas de incubación a 33°C, las células se procesaron para tinción de inmunofluorescencia. El porcentaje de células infectadas (medias ± DE) indicado en cada imagen fue un promedio de seis imágenes.

Figura 37: Cinética de crecimiento de virus recombinantes en células MDCK. Se infectaron células MDCK a una mdi de 1,0 bien a 33°C o a 4°C durante 30 minutos, se lavaron 3x con PBS. Las células infectadas se incubaron a 33°C y se recogieron los sobrenadantes de cultivo a los intervalos de tiempo indicados y se determinó la cantidad de virus mediante ensayo en placa.

Figura 38: sitios de unión a receptor en HA y NA de subtipos de H3N2. Se indican los restos que mostraron aumentar la afinidad de unión a receptor de HA y disminuir la actividad enzimática de NA en relación con los sitios de unión a ácido siálico (SIA). El monómero de HA se modeló usando 5HMG y el monómero de NA se modeló basándose en 2BAT usando WebLab VewerLite 3.10 (Accelrys, San Diego, CA).

Descripción detallada

30 Muchas cepas de virus de la gripe patógenas crecen solo de manera escasa en cultivo tisular, y no se han crecido satisfactoriamente cepas adecuadas para la producción de vacunas de virus vivo atenuado (por ejemplo, virus de la gripe sensibles a la temperatura, adaptados al frío y/o atenuados) en células cultivadas para producción comercial. La presente invención está definida por las reivindicaciones. También se describe en el presente documento un sistema de transfección multi-plásmido que permite el crecimiento y la recuperación de cepas de virus de la gripe que no están adaptadas para el crecimiento en condiciones de cultivo celular convencionales. Un desafío adicional en el desarrollo y producción de vacunas de la gripe es que una o más de las cepas de gripe en circulación pueden no replicarse bien en huevos de gallina embrionados. La presente divulgación identifica varios restos de aminoácidos que influyen las actividades de las proteínas HA y NA y ha identificado sustituciones de aminoácidos específicas que pueden modular estas actividades. En el presente documento se describe que la modulación de la actividad de unión del receptor de HA y/o la actividad de neuraminidasa NA puede potenciar la replicación de la gripe en huevos y/o células hospedadoras (por ejemplo, células Vero o MDCK). En el presente documento se describen específicamente combinaciones de sustituciones de aminoácidos en HA y/o NA que pueden potenciar la replicación viral en huevos y/o células y se demuestra que estas sustituciones de aminoácidos no tienen un impacto significativo en la antigenicidad de estos virus de la gripe recombinantes. Por lo tanto, en el presente documento se describe el uso de tecnología genética inversa para mejorar la fabricación de vacunas de virus de la gripe.

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

Típicamente, se selecciona una sola cepa de virus donante maestro (VDM) para cada uno de los subtipos A y B. En el caso de una vacuna viva atenuada, la cepa de virus donante maestro se selecciona típicamente por sus propiedades favorables, por ejemplo, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación, en relación a la producción de vacunas. Por ejemplo, las cepas donantes maestras ejemplares incluyen dichas cepas de A/Ann

Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66 sensibles a la temperatura, atenuadas y adaptadas al frío, respectivamente. La presente divulgación aclara las mutaciones subyacentes que dan como resultado los fenotipos ca, ts y att de estas cepas virales, y proporciona métodos para producir nuevas cepas de gripe adecuadas para su uso como cepas donantes en el contexto de la producción de vacunas recombinantes y reorganizantes.

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

Entonces se recupera el virus MDV-A o MDV-B recombinante infeccioso después de la transfección de plásmidos que portan los ocho ADNc virales en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células Vero, células MDCK/293T o MDCK/COS7 cocultivadas. Usando los plásmidos y los métodos descritos en el presente documento, la divulgación es útil, por ejemplo, para generar vacunas de la gripe de reorganizados 6:2 mediante cotransfección de los 6 genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) del virus seleccionado (por ejemplo, VDM-A, VDM-B) junto con la HA y la NA derivadas de virus de la gripe diferentes de tipo correspondiente (A o B). Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B patogenicamente relevante, tal como se efectúa rutinariamente para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento HA puede seleccionarse de una cepa con relevancia emergente como cepa patogénica, tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). También pueden producirse reorganizados que incorporan siete segmentos de genoma del MDV y bien el gen HA o NA de una cepa seleccionada (reorganizados 7:1). Además, este sistema es útil para determinar la base molecular de características fenotípicas, por ejemplo, los fenotipos atenuados (att), adaptados al frío (ca), y sensibles a la temperatura (ts), relevantes para la producción de vacunas.

También se describen en el presente documento métodos para manipular restos de aminoácidos de HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus de la gripe para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o células. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para modular la actividad de unión al receptor de HA y/o la actividad de neuraminidasa NA para aumentar la capacidad de un virus de la gripe para replicarse en huevos y/o células. Además, en el presente documento se describen virus de la gripe con capacidad potenciada para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o células.

DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, se entiende que todos los términos científicos y técnicos tienen el mismo significado al usado de manera común en la técnica a la que pertenecen. Para el fin de la presente divulgación se definen a continuación los siguientes términos.

Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido", "secuencia polinucleotídica" y "secuencia de ácido nucleico" se refieren a polímeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido monocatenarios o bicatenarios, o a quimeras o análogos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos de origen natural que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales en tanto que hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a los nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular descrita abarca secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente.

El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladores necesarias para su expresión. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o a un ARNm codificado por esa secuencia genómica.

Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen "promotores" y "potenciadores", a los que se unen proteínas reguladoras, tales como factores de transcripción, dando como resultado la traducción de secuencias adyacentes o próximas. Un promotor o potenciador "específico de tejido" es uno que regula la transcripción en un tipo o tipos de tejido o célula específicos.

El término "vector" se refiere a los medios mediante los cuales puede propagarse y/o transferirse un ácido nucleico entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones, y cromosomas artificiales, y similares, que se replican de manera autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto de ADN como de ARN en la misma

hebra, un ADN o ARN conjugado a poli-lisina, un ADN o ARN conjugado a un péptido, un ADN conjugado a liposomas, o similares, que no se replican autónomamente. Más comúnmente, los vectores descritos en el presente documento son plásmidos.

5 Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Típicamente, el ácido nucleico que se va a expresar está "unido operativamente" a un promotor y/o potenciador, y se somete a control regulador de la transcripción por el promotor y/o potenciador.

10 Un "vector de expresión bidireccional" está caracterizado típicamente por dos promotores alternativos orientados en direcciones opuestas en relación a un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de tal forma que pueda iniciarse la transcripción en ambas orientaciones, dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de ARN tanto de hebra más (+) o sentido, como negativo (-) o antisentido. Como alternativa, el vector de expresión bidireccional puede ser un vector ambisentido, en el que el ARNm viral y el ARN genómico viral (en forma de ARNc) se expresan a partir de la misma hebra.

15 En el contexto descrito en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que acompañan normalmente o interactúan con este en su ambiente de origen natural. El material aislado comprende opcionalmente material no encontrado con el material en su ambiente natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su ambiente natural, tal como una célula, el material se ha puesto en una localización en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativa para un material encontrado en ese ambiente. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un potenciador, etc.) se aísla si se introduce mediante medios no naturales en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, un vector, tal como un plásmido o un vector viral, o amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Dichos ácidos nucleicos también se citan como ácidos nucleicos "heterólogos".

20 El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o proteína) se ha alterado artificial o sintéticamente (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración puede efectuarse en el material en, o retirado de, su ambiente o estado natural. Específicamente, en referencia a un virus, por ejemplo, un virus de la gripe, el virus es recombinante cuando se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

25 El término "reorganizado", cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa viral o fuente progenitora. Por ejemplo, un reorganizado 7:1 incluye 7 segmentos virales genómicos (o segmentos génicos) derivados de un primer virus progenitor, y un solo segmento genómico viral complementario, por ejemplo, que codifica hemaglutinina o neuraminidasa, a partir de un segundo virus progenitor. Un reorganizado 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, más comúnmente los 6 genes internos de un primer virus progenitor, y dos segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, procedentes de un virus progenitor diferente.

30 La expresión "introducido" en referencia a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde puede incorporarse el ácido nucleico en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado de manera transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación" y "transducción". En el contexto descrito en el presente documento, pueden emplearse una variedad de métodos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

35 La expresión "célula hospedadora" significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y soporta la replicación y/o la expresión del ácido nucleico, y opcionalmente la producción de uno o más productos codificados, incluyendo un polipéptido y/o un virus. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas, tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levadura, de insecto, de anfibio, aviares o de mamífero, incluyendo células de ser humano. Las células hospedadoras ejemplares en el contexto descrito en el presente documento incluyen células Vero (riñón de mono verde africano), células Per.C6 (células reinales embrionarias humanas), células BHK (riñón de cría de hámster), células primarias de riñón de pollo (PCK), células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS (por ejemplo, células COS1 y COS7). La expresión célula hospedadora abarca combinaciones o mezclas de células, incluyendo, por ejemplo, cultivos mixtos de diferentes tipos celulares o líneas celulares (por ejemplo, células Vero y CEK). Se describe un co-cultivo de células Vero SF electroporadas, por ejemplo, en el documento PCT/US04/42669 registrado el 22 de diciembre de 2004.

40 Las expresiones "sensible a la temperatura", "adaptado al frío" y "atenuado" se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la expresión "sensible a la temperatura" ("ts") indica que el virus muestra una reducción de 100 veces o mayor en el título a 39 °C en relación a 33 °C para cepas de gripe A, y que el virus muestra una reducción de 100 veces o mayor en el título a 37 °C en relación a 33 °C para cepas de gripe B. Por ejemplo, la expresión "adaptado al frío" ("ca") indica que el virus muestra crecimiento a 25 °C dentro de 100 veces su crecimiento a 33 °C. Por ejemplo, la expresión "atenuado" ("att") indica que el virus se replica en las vías aéreas superiores de hurones, pero no es

detectable en los tejidos pulmonares, y no produce una enfermedad similar a gripe en el animal. Se entenderá que los virus con fenotipos intermedios, es decir, los virus que muestran reducciones de títulos de menos de 100 veces a 39 °C (para virus de cepa A) o de 37 °C (para virus de cepa B), que muestran crecimiento a 25 °C que es más de 100 veces su crecimiento a 33 °C (por ejemplo, en 100 veces, 500 veces, 1000 veces, 10.000 veces menos), y/o muestran crecimiento reducido en los pulmones en relación al crecimiento en las vías aéreas superiores de hurones (es decir, parcialmente atenuados) y/o enfermedad similar a gripe reducida en el animal, que posee una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento también son virus útiles descritos en el presente documento. El crecimiento indica la cantidad viral indicada por el título, tamaño de placa o morfología, la densidad de partículas u otras medidas conocidas por los expertos en la materia.

La expresión "diseñado por ingeniería genética de manera artificial" se usa en el presente documento para indicar que el virus, el ácido nucleico viral o el producto codificado de manera viral, por ejemplo, un polipéptido, una vacuna, comprenden al menos una mutación introducida mediante métodos recombinantes, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido, mutagénesis por PCR, etc. La expresión "diseñado por ingeniería genética de manera artificial", cuando se refiere a un virus (o a un componente o producto viral) que comprende una o más mutaciones de nucleótido y/o sustituciones de aminoácidos indica que el genoma viral o el segmento genómico que codifica el virus (o componente o producto viral) no procede de fuentes naturales, tales como una cepa de origen natural o de laboratorio preexistente de virus producida mediante métodos no recombinantes (tales como paso progresivo a 25°C), por ejemplo, una cepa A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66 de tipo silvestre o adaptada al frío.

Virus de la gripe

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

En el presente documento, el ARN genómico viral correspondiente a cada uno de los ocho segmentos se inserta en un vector recombinante para la manipulación y producción de virus de la gripe. Una diversidad de vectores, incluyendo vectores virales, plásmidos, cósmidos, fagos, y cromosomas artificiales, pueden emplearse en el contexto descrito en el presente documento. Típicamente, por facilidad de manipulación, los segmentos genómicos virales se insertan en un vector plasmídico, proporcionando uno o más orígenes de replicación funcionales en células bacterianas y eucariotas, y, opcionalmente, un marcador conveniente para explorar o seleccionar células que incorporan la secuencia plasmídica. Un vector ejemplar, el plásmido pAD3000 se ilustra en la Figura 1.

Más comúnmente, los vectores plasmídicos descritos en el presente documento son vectores de expresión bidireccionales capaces de iniciar la transcripción del segmento genómico viral insertado en cualquier dirección, es decir, dando lugar a moléculas de ARN viral tanto de hebra (+) como de hebra (-). Para efectuar la transcripción bidireccional, cada uno de los segmentos genómicos virales se inserta en un vector que tiene al menos dos promotores independientes, de tal forma que se transcriben las copias del ARN genómico viral mediante un primer promotor de ARN polimerasa (por ejemplo, Pol I), de una hebra, y se sintetizan ARNm virales a partir de un segundo promotor de ARN polimerasa (por ejemplo, Pol II). Por consiguiente, se disponen los dos promotores en orientaciones opuestas flanqueando a cada sitio de clonación (es decir, una secuencia de reconocimiento por enzima de restricción), preferentemente un sitio de clonación único, adecuados para la inserción de segmentos de ARN genómico viral. Como alternativa, puede emplearse un vector "ambisentido" en el que el ARNm de hebra (+) y el ARN viral de hebra (-) (como un ARNc) se transcriben a partir de la misma hebra del vector.

Vectores de expresión

El segmento genómico del virus de la gripe que va a expresarse se une operativamente a una secuencia de control de la transcripción adecuada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Una variedad de promotores son adecuados para su uso en vectores de expresión para regular la transcripción de segmentos genómicos del virus de la gripe. Por ejemplo, en caso de que el vector sea el plásmido pAD3000, se utiliza el promotor de ARN polimerasa II (pol II) dependiente de ADN de citomegalovirus (CMV). Si se desea, por ejemplo, para regular la expresión condicional, pueden sustituirse otros promotores que inducen la transcripción de ARN en condiciones especificadas, o en los tejidos o células especificadas. Hay disponibles numerosos promotores virales y de mamífero, por ejemplo, humanos, o pueden aislarse de acuerdo con la aplicación específica contemplada. Por ejemplo, los promotores alternativos obtenidos a partir de los genomas de virus de animales y seres humanos incluyen promotores tales como los promotores de adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma, virus de la hepatitis B, virus de polioma y virus de simio 40 (SV40), y varios promotores retrovirales. Los promotores de mamífero incluyen, entre otros muchos, el promotor de actina, promotores de inmunoglobulina, promotores de choque por calor, y similares. Además, pueden emplearse promotores de bacteriófagos en conjunción con la ARN polimerasa afín, por ejemplo, el promotor T7.

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

Los vectores descritos en el presente documento también incluyen de manera favorable las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm, tales como un sitio de poliadenilación o una secuencia de terminación. Dichas secuencias están fácilmente disponibles a partir de las regiones 5' y en ocasiones 3' no traducidas de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Por ejemplo, implicando al plásmido pAD3000, las secuencias de poliadenilación de SV40 proporcionan una señal de poliadenilación.

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

El vector que contiene la secuencia de ADN adecuada tal como se describe anteriormente, así como un promotor o secuencia de control adecuada, pueden emplearse para transformar una célula hospedadora, permitiendo la expresión de la proteína. Aunque los vectores descritos en el presente documento pueden replicarse en células bacterianas, será más frecuentemente deseable introducirlos en células de mamífero, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293, células COS, para el fin de la expresión.

Elementos de expresión adicionales

Más comúnmente, el segmento genómico que codifica la proteína del virus de la gripe incluye cualquier secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo la traducción en una proteína viral funcional. En otras situaciones, puede emplearse un minigén, u otra construcción artificial que codifica las proteínas virales, por ejemplo, una proteína HA o NA. En este caso, a menudo es deseable incluir señales de iniciación específicas que ayudan a la traducción eficaz de la secuencia codificante heteróloga. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Para asegurar la traducción de la inserción completa, se inserta el codón de iniciación en el marco de lectura correcto en relación a la proteína viral. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de iniciación pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores adecuados para el sistema celular que se esté usando.

Si se desea, pueden incorporarse secuencias polinucleotídicas que codifican elementos expresados adicionales, tales como secuencias de señal, secuencias de secreción o localización, y similares en el vector, generalmente, en fase con la secuencia del polinucleótido de interés, por ejemplo, para dirigir la expresión del polipéptido a un compartimento celular, membrana, u orgánulo deseado, o en el medio de cultivo celular. Dichas secuencias se conocen por los expertos, e incluyen péptidos líderes de secreción, secuencias de dirección a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en el RE, secuencias de tránsito mitocondrial), secuencias de localización/anclaje en membrana (por ejemplo, secuencias de detención de la transferencia, señales de ancla de GPI), y similares.

Vacunas de virus de la gripe

Históricamente, las vacunas de virus de la gripe se han producido en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionadas basándose en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus reorganizantes que incorporan antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra aprobada atenuada, sensible a la temperatura. Después del cultivo del virus a través de múltiples pases en huevos de gallina, se recuperan los virus de la gripe y, opcionalmente, se inactivan, por ejemplo, usando formaldehído y/o β -propiolactona. Sin embargo, la producción de vacuna de la gripe de este modo tiene varios inconvenientes significativos. Los contaminantes que quedan de los huevos de gallina son elevadamente antigénicos, pirogénicos, y frecuentemente dan como resultado efectos secundarios significativos tras su administración. De manera más importante, las cepas designadas para la producción tienen que seleccionarse y distribuirse, típicamente meses antes de la siguiente estación de gripe, para dar tiempo para la producción e inactivación de la vacuna de la gripe. Los intentos de producción de vacunas recombinantes y reorganizantes en cultivo celular se han visto impedidos por la incapacidad de ninguna de las cepas aprobadas para la producción de vacunas de crecer de manera eficaz en condiciones de cultivo celular convencionales.

También se describe en el presente documento un sistema de vector, y métodos para producir virus recombinantes y reorganizantes en cultivo que hacen posible producir rápidamente vacunas que corresponden a una o varias cepas antigénicas de virus. En particular, se proporcionan condiciones y cepas que dan como resultado una producción eficaz de virus a partir de un sistema multi-plásmido en cultivo celular. Opcionalmente, si se desea, los virus pueden amplificarse adicionalmente en huevos de gallina.

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

Típicamente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como una incubadora de cultivos celulares, en condiciones de humedad y CO₂ controladas, a una temperatura constante usando un regulador de la temperatura, tal como un termostato para asegurar que la temperatura no supera los 35 °C.

Los virus de la gripe reorganizantes pueden obtenerse fácilmente introduciendo un subconjunto de vectores que corresponden a segmentos genómicos de un virus de gripe maestro, en combinación con segmentos complementarios procedentes de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de interés). Típicamente, las cepas maestras se seleccionan basándose en propiedades deseables relevantes para la administración de vacunas. Por ejemplo, para la producción de vacunas, por ejemplo, para la producción de una vacuna viva atenuada, la cepa de virus donante maestro puede seleccionarse respecto de un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura. En este contexto, la cepa ca de gripe A, A/Ann Arbor/6/60; la cepa ca de gripe B, B/Ann Arbor/1/66; u otra cepa seleccionada respecto de sus propiedades fenotípicas, por ejemplo, una cepa atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, tal como una cepa de gripe A diseñada por ingeniería genética de manera artificial tal como se describe en el Ejemplo 4 o una cepa de gripe B diseñada por ingeniería genética de manera artificial que incorporan una o más de las sustituciones de aminoácidos especificadas en la Tabla 17 se seleccionan de manera favorable como cepas donantes maestras.

Los plásmidos que incorporan los seis genes internos de la cepa de virus maestra de gripe (es decir, PB1, PB2, PA, NP, NB, M1, BM2, NS1 y NS2) pueden transfectarse en células hospedadoras adecuadas en combinación con segmentos de hemaglutinina y neuraminidasa de una cepa antigénicamente deseable, por ejemplo, una cepa en la que se predice que causa una infección de gripe local o global significativa. Después de la replicación del virus reorganizador en cultivo celular a temperaturas adecuadas para una recuperación eficaz, por ejemplo, menor o igual a 35 °C, tal como entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, por ejemplo, entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, o a aproximadamente 33 °C, se recuperan los virus reorganizantes. Opcionalmente, el virus recuperado puede inactivarse usando un agente desnaturante, tal como formaldehído o β -propiolactona.

Vacunas de virus de la gripe atenuados, sensibles a la temperatura y adaptados al frío

En un aspecto, la presente divulgación se basa en la determinación de las mutaciones subyacentes al fenotipo ts en cepas donantes maestras preferidas del virus. Para determinar la importancia funcional de cambios de un solo nucleótido en el genoma de la cepa de VDM, se evaluaron virus reorganizantes procedentes de cepas altamente relacionadas del linaje A/AA/6/60 respecto de su sensibilidad a la temperatura. La naturaleza isogénica de las dos cepas progenitoras permite la evaluación de cambios de un solo nucleótido en el fenotipo ts. Por consiguiente, la base genética para el fenotipo ts de VDM-A se mapea a nivel de nucleótidos para especificar restos de aminoácidos en PB1, PB2, y NP.

Los intentos anteriores para mapear la base genética del fenotipo ts de ca A/AA/6/60 utilizaron técnicas clásicas de coinfección/reorganizantes para crear reorganizantes de un solo gen y de múltiples genes entre A/AA/6/60 y una

cepa wt no relacionada. Estos estudios sugirieron que tanto PB2 como PB1 contribuyeron al fenotipo ts (Kendal et al. (1978) Biochemical characteristics of recombinant viruses derived at sub-optimal temperatures: evidence that ts lesions are present in RNA segments 1 and 3, and that RNA 1 codes for the virion transcriptase enzyme, p. 734-743. En B. W. J. Mahy, y R.D. Barry (ed.) Negative Strand Viruses, Academic Press; Kendal et al. (1977) Comparative studies of wild-type and cold mutant (temperature sensitive) influenza viruses: genealogy of the matrix (M) and the non-structural (NS) proteins in recombinant cold-adapted H3N2 viruses J Gen Virol 37:145-159; Kendal et al. (1979) Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature sensitive) influenza viruses: independent segregation of temperature-sensitivity of virus replication from temperature-sensitivity of virion transcriptase activity during recombination of mutant A/Ann Arbor/6/60 with wild-type H3N2 strains J Gen Virol 44:443-456; Snyder et al. (1988) Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines J Virol 62:488-95). La interpretación de estos estudios, sin embargo, se confundió debido a efectos de constelación, que estuvieron causados por la mezcla de segmentos génicos de dos cepas de gripe A divergentes. Las interacciones debilitadas podrían haber sucedido a través de cambios entre los segmentos génicos de A/AA/6/60 y de wt distintos de aquellos implicados específicamente en la expresión del fenotipo ts a partir del origen de A/AA/6/60. También se demostró que los efectos de constelación confundieron la interpretación de la asociación del segmento génico M con el fenotipo att (Subbarao et al. (1992) The attenuation phenotype conferred by the M gene of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted virus (H2N2) on the A/Korea/82 (H3N2) reassortant virus results from a gene constellation effect Virus Res 25:37-50).

Las mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácidos en las posiciones PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ se identifican en el presente documento como funcionalmente importantes para conferir el fenotipo sensible a la temperatura al virus de cepa VDM-A. Como apreciarán los expertos en la materia, las mutaciones en nucleótidos en las posiciones PB1¹¹⁹⁵, PB1¹⁷⁶⁶, PB1²⁰⁰⁵, PB2⁸²¹ y NP¹⁴⁶ designan sustituciones de aminoácidos en PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴, respectivamente. Por lo tanto, también se describen en el presente documento cualesquiera sustituciones de nucleótidos que den como resultado aminoácidos sustituidos en estas posiciones. Las mutaciones ejemplares PB1³⁹¹ (K391 E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G), de manera individual, y más preferentemente en combinación, dan como resultado un fenotipo sensible a la temperatura. La reversión simultánea de estas mutaciones a tipo silvestre suprime el fenotipo ts, mientras que la introducción de estas mutaciones en un origen de tipo silvestre da como resultado virus con un fenotipo ts. De manera consistente con la estabilidad de estos fenotipos durante el pase del virus, ningún cambio individual puede revertir individualmente el perfil de sensibilidad a la temperatura del virus resultante al de tipo silvestre. En cambio, estos cambios parecen actuar en concierto entre sí para expresar completamente el fenotipo ts. Este descubrimiento permite el diseño por ingeniería genética de cepas adicionales de virus de gripe A sensible a la temperatura adecuadas para virus donantes maestros para la producción de vacunas de gripe vivas atenuadas.

De manera similar, las sustituciones de aminoácidos individuales en una cepa de virus donante maestro B se correlacionan con el fenotipo ts, tal como se ilustra en la Tabla 17. Por lo tanto, los métodos presentados en el presente documento están adaptados para producir nuevas cepas de gripe B con fenotipos sensibles a la temperatura, y opcionalmente atenuados y/o adaptados al frío mediante la introducción de una o más mutaciones especificadas en un genoma de gripe B. Por ejemplo, se introducen una o más mutaciones que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³ en el genoma de una cepa de gripe B para producir un virus de la gripe B sensible a la temperatura. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen las siguientes: PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V).

En el presente documento se describen virus de la gripe que incorporan las mutaciones independientemente del método mediante el que se producen. Es decir, también se describen en el presente documento cepas de gripe que incluyen las mutaciones descritas en el presente documento, por ejemplo, cualquier virus de gripe A con una sustitución de aminoácidos en relación al tipo silvestre en una o más posiciones seleccionadas entre: PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ y NP³⁴ o cualquier virus de gripe B con una sustitución de aminoácidos en relación al tipo silvestre en una o más posiciones seleccionadas entre: PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵⁰⁹, M1¹⁵⁹ y M1¹⁸³, con la salvedad de no considerar como descritas en el presente documento las cepas ca A/Ann Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66. Los virus de gripe A pueden incluir una diversidad de mutaciones (por ejemplo, dos, o tres, o cuatro, o cinco, o más mutaciones) seleccionadas entre PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) y NP³⁴ (D34G); y los virus de gripe B incluyen una diversidad de mutaciones seleccionadas entre PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V), respectivamente. Por ejemplo, además de proporcionar virus con los fenotipos deseados relevantes para la producción de vacunas, son adecuados los virus con un subconjunto de mutaciones, por ejemplo, 1, o 2, o 3, o 4, o 5 mutaciones seleccionadas para dilucidar la contribución de las mutaciones adicionales al fenotipo del virus. Los virus de la gripe pueden incluir al menos un nucleótido adicional no de tipo silvestre (por ejemplo, dando posiblemente como resultado una sustitución adicional de aminoácidos), que refina opcionalmente el fenotipo deseado o confiere un atributo fenotípico deseable adicional.

Replicación viral potenciada

En el presente documento también se describe un método para la introducción de al menos una sustitución de resto de aminoácido en HA y/o NA para aumentar la capacidad de un virus de la gripe para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o en células hospedadoras. También se describen en el presente documento variantes de virus de la gripe con capacidad aumentada para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o en células hospedadoras (citadas en el presente documento como "variantes re replicación potenciada") cuando se comparan con virus de la gripe sin sustituciones en HA y/o NA. Se contempla específicamente que el método descrito en el presente documento pueda utilizarse para potenciar la replicación de un virus de la gripe en una célula hospedadora y que las variantes de replicación potenciada puedan tener replicación potenciada en huevos de gallina y/o células hospedadoras. Las células adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T y células COS7.

El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos en HA y/o NA que potenciará la capacidad de un virus de la gripe para replicarse en huevos y/o células hospedadoras en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%, o en al menos un 300%, o en al menos un 400%, o en al menos un 500% en comparación con el virus de la gripe no modificado. Se contempla específicamente que puedan efectuarse las modificaciones de aminoácidos tanto en HA como en NA. Preferentemente, el método descrito en el presente documento no altera significativamente la antigenicidad del virus de la gripe sustituido cuando se compara con el virus de la gripe no sustituido. El método descrito en el presente documento reduce la antigenicidad del virus de la gripe sustituido en comparación con el virus de la gripe no sustituido en menos de un 10%, o en menos de un 20%, o en menos de un 30%, o en menos de un 40%, o en menos de un 50%, o en menos de un 60%, o en menos de un 70%, o en menos de un 80%, o en menos de un 90%, o en menos de un 100%. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la antigenicidad viral (véase también el "Ejemplo 11", anteriormente citado).

El método descrito en el presente documento incorpora además un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas características deseables. Preferentemente, los virus incorporados mediante el método descrito en el presente documento incluyen, pero sin limitación, el virus de la gripe de cepa B/Ann Arbor/1/66, el virus de la gripe de cepa A/Ann Arbor/6/60. El método descrito en el presente documento puede introducir vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa viral seleccionada por sus propiedades favorables en relación a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos genómicos que codifican los antígenos de superficie de HA y NA manipulados deseados para producir virus de gripe con capacidad potenciada para replicarse en huevos de gallina embrionados y/o en células hospedadoras (véase más arriba y el "Ejemplo 11"). Los métodos descritos en el presente documento pueden incorporar además un virus de la gripe no atenuado.

El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos que modula la actividad de unión a receptor de HA. La actividad de unión a receptor de HA incluye, pero sin limitación, la unión de HA a restos de ácido siálico (por ejemplo, restos de sialilo-galactosilo unidos en 2,6 [Sia α (2,6)Gal] y restos de sialilo-galactosilo unidos en 2,3 [Sia α (2,3)Gal]) presentes en las glucoproteínas o glucolípidos de la superficie celular. En "Ejemplo 11" (más adelante) se presenta un método para ensayar la unión de HA. Se conocen bien otros métodos en la técnica. El método descrito en el presente documento puede introducir sustituciones de aminoácidos que modulan la especificidad de unión a receptor de HA para restos de [Sia α (2,6)Gal] y/o [Sia α (2,3)Gal]. Preferentemente, el método potenciará la unión de HA a restos de [Sia α (2,3)Gal].

El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos que potencia la actividad de unión a receptor de HA. Preferentemente, la actividad de unión a receptor aumenta en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la actividad de unión a receptor de HA. Preferentemente, la actividad de unión a receptor se reduce en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

El método puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos en las posiciones 183, 186 y/o 226 de HA. De acuerdo con la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se efectúan sustituciones de aminoácidos en las posiciones 183 y 226, de tal forma que la posición 183 es una leucina y la posición 226 es una alanina.

El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos que modula la actividad de neuraminidasa de NA. La actividad de neuraminidasa de NA incluye, pero sin limitación, la hidrólisis de sustratos que contienen ácido N-acetilneuramínico unido de manera alfa-cetosídica (Neu5Ac). Los métodos para

determinar la actividad de neuraminidasa se conocen bien en la técnica (véase también el "Ejemplo 11" más adelante).

- 5 El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos que potencia la actividad de neuraminidasa de NA. Preferentemente, la actividad de unión a receptor aumenta en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.
- 10 El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la actividad de neuraminidasa de NA. Preferentemente, la actividad de neuraminidasa se reduce en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.
- 15 El método descrito en el presente documento puede introducir al menos una sustitución de aminoácidos en las posiciones 119 y/o 136 de NA. Preferentemente, las sustituciones se efectúan de tal modo que la posición 119 es un glutamato y la posición 136 es una glutamina.
- 20 Un experto en la materia apreciará que en algunos casos, la proteína HA y/o NA ya tendrá los restos de aminoácido preferidos en una o más de las posiciones anteriormente mencionadas. En esta situación, se introducirán sustituciones solo en las posiciones restantes no coincidentes.
- 25 Se contempla específicamente que puedan efectuarse sustituciones conservativas de aminoácidos para dichas sustituciones de aminoácidos en las posiciones 183, 186 y/o 226 de HA y en las posiciones 119 y/o 136 de NA, descritas anteriormente.
- 30 Se sabe bien en la técnica que "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a sustituciones de aminoácidos que sustituyen aminoácidos funcionalmente equivalentes. Los cambios conservativos de aminoácidos dan como resultado cambios silentes en la secuencia de aminoácidos del péptido resultante. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de una polaridad similar actúan como equivalentes funcionales y dan como resultado una alteración silente en la secuencia de aminoácidos del péptido. También pueden considerarse como "sustituciones conservativas" aquellas sustituciones que son de carga neutra y que sustituyen a un resto con un resto más pequeño, incluso si los restos se encuentran en grupos diferentes (por ejemplo, sustitución de fenilalanina con isoleucina, más pequeña). Se han definido en la técnica familias de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Las familias de sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen, pero sin limitación, no polares (por ejemplo, Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro), polares no cargadas (por ejemplo, Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys), ácidas/cargadas negativamente (por ejemplo, Asp, Glu), básicas/cargadas positivamente (por ejemplo, Arg, Lys, His), beta-ramificadas (por ejemplo, Thr, Val, Ile), restos que influyen la orientación de cadena (por ejemplo, Gly, Pro) y aromáticas (por ejemplo, Trp, Tyr, Phe, His). La expresión "sustitución conservativa de aminoácidos también se refiere al uso de análogos o variantes de aminoácidos. Se proporciona una orientación referente a cómo preparar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silentes en Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," (1990, Science 247:1306-10).
- 35 40 45 También se describen en el presente documento virus de la gripe modificados, citados en el presente documento como variantes de gripe de "replicación potenciada", que incorporan al menos una sustitución de aminoácidos en HA y/o NA que potencia su replicación en huevos de gallina embrionados y/o en células hospedadoras cuando se comparan con los virus de la gripe no modificados. Preferentemente, la capacidad de replicación de una variante de gripe de replicación potenciada en huevos y/o células hospedadoras se ha potenciado en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%, o en al menos un 300%, o en al menos un 400%, o en al menos un 500% en comparación con el virus de la gripe no modificado.
- 50 55 Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar además un virus de gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas características deseables. Preferentemente, el virus incorporado en una variante de gripe de replicación potenciada incluye, pero sin limitación, el virus de la gripe de cepa B/Ann Arbor/1/66, el virus de la gripe de cepa A/Ann Arbor/6/60. Se contempla específicamente que se produzca una variante de gripe de replicación potenciada introduciendo vectores que incluyen los seis genes internos de una cepa viral seleccionada por sus propiedades favorables referentes a la producción de vacunas, en combinación con los segmentos genómicos que codifican los antígenos de superficie de HA y NA sustituidos deseados (véase más arriba y el "Ejemplo 11").
- 60 65 Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos en HA que modula la actividad de unión a receptor de HA (véase más arriba). Preferentemente, el método potenciará la unión de HA a restos de [Sia(2,3)Gal].

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que potencia la actividad de unión a receptor de HA. Preferentemente, la actividad de unión a receptor aumenta en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%. Se contempla específicamente que una variante de gripe potenciada en huevo no tenga una antigenicidad viral significativamente alterada cuando se compara con el virus de la gripe no sustituido. Una variante de gripe de replicación potenciada puede tener una antigenicidad que se reduce en menos de un 10%, o en menos de un 20%, o en menos de un 30%, o en menos de un 40%, o en menos de un 50%, o en menos de un 60%, o en menos de un 70%, o en menos de un 80%, o en menos de un 90%, o en menos de un 100% cuando se compara con el virus no sustituido. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la antigenicidad viral (véase también el "Ejemplo 11", anteriormente citado).

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la actividad de unión a receptor de HA. Preferentemente, la actividad de unión a receptor se reduce en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos en HA en las posiciones 183, 186 y/o 226. De acuerdo con la invención, tal como se define en las reivindicaciones, las sustituciones de aminoácidos están presentes en las posiciones 183 y 226, de tal forma que la posición 183 es una leucina y la posición 226 es una alanina.

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que modula la actividad de neuraminidasa de NA (véase más arriba).

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que potencia la actividad de neuraminidasa de NA. Preferentemente, la actividad de unión a receptor aumenta en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la actividad de neuraminidasa de NA. Preferentemente, la actividad de neuraminidasa se reduce en al menos un 10%, o en al menos un 20%, o en al menos un 30%, o en al menos un 40%, o en al menos un 50%, o en al menos un 60%, o en al menos un 70%, o en al menos un 80%, o en al menos un 90%, o en al menos un 100%, o en al menos un 200%.

Una variante de gripe de replicación potenciada puede incorporar al menos una sustitución de aminoácidos en NA en las posiciones 119 y/o 136. Preferentemente, las sustituciones se efectúan de tal modo que la posición 119 es un glutamato y la posición 136 es una glutamina.

Cultivo celular

Típicamente, la propagación del virus se logra en las composiciones de medio en las que se cultivan normalmente las células hospedadoras. Las células adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T y células COS7. Comúnmente, se emplean co-cultivos que incluyen dos de las líneas celulares anteriores, por ejemplo, células MDCK y células 293T o COS a una relación, por ejemplo, de 1:1, para mejorar la eficacia de la replicación. Típicamente, las células se cultivan en un medio de cultivo comercial estándar, tal como medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero (por ejemplo, suero fetal bovino al 10 %), o en medio sin suero, con humedad controlada y una concentración de CO₂ adecuada para mantener un pH tamponado neutro (por ejemplo, a un pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomycin, etc., y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, suplementos adicionales para promover características de crecimiento favorables, por ejemplo, tripsina, β -mercaptoetanol, y similares.

Los procedimientos para mantener a las células de mamífero en cultivo se han comunicado de manera extensiva, y son conocidos para los expertos en la materia. Se proporcionan protocolos generales, por ejemplo, en Freshney (1983) *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Nueva York; Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edimburgo; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work y Burdon (eds.) Elsevier, Ámsterdam. Los detalles adicionales referentes a los procedimientos de cultivo tisular de interés particular en la producción de virus de la gripe *in vivo* incluyen, por ejemplo, Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*. En Cohen y Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Además, se determinan fácilmente variaciones en dichos procedimientos adaptados para la presente divulgación mediante experimentación rutinaria.

Las células para la producción de virus de la gripe pueden cultivarse en medio con suero o sin suero. En algunos casos, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, es deseable crecer las células hospedadoras en condiciones sin suero. Las células pueden cultivarse a pequeña escala, por ejemplo, en menos de 25 ml de medio, tubos o matraces de cultivo, o en grandes matraces con agitación, en botellas rotatorias, o en perlas microtransportadoras (por ejemplo, perlas microtransportadoras de DEAE-dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer y Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-trimetilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en matraces, botes o cultivos en reactor. Las perlas microtransportadoras son pequeñas esferas (en el intervalo de 100-200 micras de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para crecimiento celular adherente por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un solo litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas microtransportadoras que proporcionan más de 8000 centímetros cuadrados de superficie de crecimiento. Para la producción comercial de virus, por ejemplo, para la producción de vacunas, a menudo es deseable cultivar las células en un biorreactor o en un fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes desde menos de 1 litro hasta más de 100 litros, por ejemplo, Biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores a escala de laboratorio o comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, en el contexto descrito en el presente documento, es importante que se mantengan los cultivos a una temperatura menor o igual a 35 °C, para asegurar una recuperación eficaz de virus de la gripe recombinantes y/o reorganizantes usando el sistema multiplásmido descrito en el presente documento. Por ejemplo, las células se cultivan a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, típicamente a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, normalmente a aproximadamente 33 °C.

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

Introducción de vectores en células hospedadoras

Los vectores que comprenden segmentos genómicos de la gripe se introducen (por ejemplo, transfectan) en células hospedadoras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, co-precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. Por ejemplo, pueden transfectarse vectores, por ejemplo, plásmidos en células hospedadoras, tales como células COS, células 293T o combinaciones de células COS o 293T y células MDCK, usando un reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se introducen aproximadamente 1 µg de cada vector en la población de células hospedadoras con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferentemente medio sin suero, en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incuban a temperatura ambiente durante 45 min seguido de la adición de 800 µl de medio. La mezcla de transfección se añade a las células hospedadoras, y se cultivan las células como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, para la producción de virus recombinantes o reorganizados en cultivo celular, se mezclan vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos de genoma (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se transfectan en las células hospedadoras. Opcionalmente, se reemplaza el medio que contiene suero antes de la transfección por medio sin suero, por ejemplo, Opti-MEM I, y se incuba durante 4-6 horas.

Como alternativa, puede emplearse electroporación para introducir vectores que incorporan segmentos genómicos de la gripe en células hospedadoras. Por ejemplo, se introducen de manera favorable vectores de plásmido que incorporan un virus de la gripe A o de la gripe B en células Vero usando electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. En resumen, 5×10^6 células Vero, por ejemplo, crecidas en medio Eagle modificado (MEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % se resuspenden en 0,4 ml de OptiMEM y se ponen en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 µl a las células en la cubeta, que a continuación se mezcla suavemente dando unos golpecitos suaves. La electroporación se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, un dispositivo Gene Pulser II de BioRad con un dispositivo Capacitance Extender Plus conectado) a 300 voltios, 950 microfaradios con una constante de tiempo de entre 28-33 milisegundos. Entonces se vuelven a mezclar las células dando golpecitos suaves y aproximadamente 1-2 minutos después de la electroporación se añaden 0,7 ml de MEM con FBS al 10% directamente a la cubeta. Las células se transfectan entonces a dos pocillos de una placa de cultivo tisular estándar de 6 pocillos que contiene 2 ml de MEM. FBS a, 10% u OPTI-MEM sin suero. La cubeta se lava para recuperar cualquier célula restante y la suspensión de lavado se divide entre dos pocillos. El volumen final es de aproximadamente 3,5 ml. Las células se incuban entonces en condiciones permisivas para el crecimiento viral, por ejemplo, a aproximadamente 33 °C para las cepas adaptadas al frío.

Recuperación de virus

Los virus se recuperan típicamente del medio de cultivo, en el que han crecido las células infectadas (transfectadas). Típicamente, se aclara el medio antes de la concentración de los virus de la gripe. Los métodos comunes incluyen filtración, ultrafiltración, adsorción en sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, el medio en bruto de cultivos infectados puede aclararse primeramente mediante centrifugación a, por ejemplo, 1000-2000 x g durante un

tiempo suficiente para eliminar los restos de células y otra materia en partículas grandes, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Como alternativa, el medio se filtra a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8 µm para eliminar a las células intactas y otra materia en partículas grandes. Opcionalmente, el sobrenadante del medio aclarado se centrifuga para precipitar los virus de la gripe, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Después de la resuspensión del precipitado de virus en un tampón adecuado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4, el virus se concentra mediante centrifugación de gradiente de densidad en sacarosa (60 %-12 %) o tartrato de potasio (50 %-10 %). Los gradientes continuos o escalonados, por ejemplo, un gradiente de sacarosa entre el 12 % y el 60 % en cuatro etapas de 12 %, son adecuados. Los gradientes se centrifugan a una velocidad y durante un tiempo suficiente para concentrar los virus en una banda visible para su recuperación. Como alternativa, y para la mayoría de aplicaciones comerciales a gran escala, el virus se elutria a partir de gradientes de densidad usando un rotor de centrifugación zonal que opera en modo continuo. Se proporcionan detalles adicionales suficientes para orientar a un experto a lo largo de la preparación de virus de la gripe a partir de cultivo tisular, por ejemplo, en Furminger. Vaccine Production, en Nicholson et al. (eds) Textbook of Influenza págs. 324-332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. En Cohen y Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines págs. 141-151, y en la Patente de Estados Unidos nº 5.690.937. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80 °C en presencia de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) como estabilizante.

Métodos y composiciones para la administración profiláctica de vacunas

Los virus recombinantes y reorganizantes descritos en el presente documento pueden administrarse profilácticamente en un vehículo o excipiente adecuado para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas del virus de la gripe. Típicamente, el vehículo o excipiente es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución salina acuosa, soluciones salinas tamponadas acuosas, soluciones de dextrosa acuosas, soluciones de glicerol acuosas, etanol, fluido alantoico de huevos de gallina no infectados (es decir, fluido alantoico normal, "NAF") o combinaciones de los mismos. La preparación de dichas soluciones asegurando la esterilidad, el pH, la isotonicidad, y la estabilidad se efectúa de acuerdo con protocolos establecidos en la técnica. En general, se selecciona un vehículo o excipiente para minimizar los efectos alérgicos y otros no deseados, y para ajustarse a la ruta de administración particular, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

En general, los virus de la gripe descritos se administran en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmune específica para una o más cepas de virus de la gripe. Preferentemente, la administración de los virus de la gripe suscita una respuesta inmune protectora. Las dosificaciones y métodos para provocar una respuesta inmune protectora contra una o más cepas de gripe se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, los virus de la gripe inactivados se proporcionan en el intervalo de aproximadamente 1-1000 DIH₅₀ (dosis infecciosa en humanos), es decir, a aproximadamente 10⁵ -10⁸ ufp (unidades formadoras de placa) por dosis administrada. Como alternativa, se administran aproximadamente 10-50 µg, por ejemplo, aproximadamente 15 µg de HA sin adyuvante, administrándose dosis menores con un adyuvante. Típicamente, la dosis se ajustará dentro de este intervalo basándose en, por ejemplo, la edad, estado físico, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra por vía sistémica, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y una jeringuilla, o un dispositivo de inyección sin aguja. Como alternativa, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, bien en gotas, aerosol de partículas grandes (mayores de aproximadamente 10 micrometros), o spray en el tracto respiratorio superior. Aunque cualquiera de las rutas de administración anteriores da como resultado una respuesta inmunitaria sistémica protectora, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad mucosal en el sitio de entrada del virus de la gripe. Para administración intranasal, se prefieren a menudo vacunas de virus vivo atenuado, por ejemplo, un virus de la gripe atenuado, adaptado al frío y/o sensible a la temperatura recombinante o reorganizante. Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmune protectora con una sola dosis, pueden administrarse dosis adicionales mediante la misma ruta o diferentes, para lograr el efecto profiláctico deseado.

Como alternativa, puede estimularse una respuesta inmune dirigiéndose *ex vivo* o *in vivo* a células dendríticas con virus de la gripe. Por ejemplo, se exponen células dendríticas en proliferación a virus en una cantidad suficiente y durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la captura de los antígenos de la gripe por las células dendríticas. Entonces se transfieren las células a un sujeto que va a vacunarse mediante métodos de trasplante intravenoso convencionales.

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

Si se desea, puede efectuarse la administración profiláctica de vacunas de virus de la gripe conjuntamente con la administración de una o más moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento

(por ejemplo, factor estimulante de colonias (CSF) de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que los virus de la gripe, o pueden administrarse por separado. Pueden administrarse la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína para producir un efecto inmunoestimulador.

Los vectores descritos en el presente documento que incluyen genoma de gripe pueden emplearse para introducir ácidos nucleicos heterólogos en un organismo hospedador o célula hospedadora, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, células procedentes de un sujeto humano, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéutico adecuado, tal como se describe anteriormente. Típicamente, el ácido nucleico heterólogo se inserta en una región no esencial de un gen o segmento génico, por ejemplo, el gen M del segmento 7. La secuencia polinucleotídica heteróloga puede codificar un polipéptido o péptido, o un ARN, tal como un ARN antisentido o ribozima. Entonces se introduce el ácido nucleico heterólogo en un hospedador o célula hospedadora produciendo virus recombinantes que incorporan el ácido nucleico heterólogo, y los virus se administran tal como se describe anteriormente.

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

Como alternativa, los virus que comprenden un ácido nucleico heterólogo pueden administrarse a las células de un sujeto *in vivo*. Típicamente, dichos métodos implican la administración de partículas de vector a una población de células diana (por ejemplo, células sanguíneas, células cutáneas, células hepáticas, células neurales (incluyendo del cerebro), células renales, células uterinas, células musculares, células intestinales, células de cuello de útero, células vaginales, células prostáticas, etc., así como células tumorales procedentes de una diversidad de células, tejidos y/u órganos. La administración puede ser bien sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa de partículas virales, o mediante administración de las partículas virales directamente a un sitio o sitios de interés mediante una diversidad de métodos, incluyendo inyección (por ejemplo, usando una aguja o jeringuilla), administración de vacuna sin aguja, administración tópica, o a presión en un tejido, órgano o sitio de la piel. Por ejemplo, las partículas de vector viral pueden administrarse por inhalación, por vía oral, intravenosa, subcutánea, subdérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, mediante administración vaginal o rectal, o colocando las partículas virales en una cavidad u otro sitio del organismo, por ejemplo, durante la cirugía.

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

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

Kits

Para facilitar el uso de los vectores y sistemas de vectores descritos en el presente documento, cualquiera de los vectores, por ejemplo, plásmidos de virus de la gripe consenso, plásmidos de polipéptidos de la gripe variantes, plásmidos de bibliotecas de polipéptidos de gripe, etc., y componentes adicionales, tales como, tampones, células, medio de cultivo, útil para el empaquetamiento y la infección de virus de la gripe con fines experimentales o terapéuticos, pueden empaquetarse en forma de kit. Típicamente, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para efectuar los métodos descritos en el presente documento, material de envase y un recipiente.

Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas virales

En el contexto descrito en el presente documento, los ácidos nucleicos y/o proteínas de la gripe se manipulan de acuerdo con técnicas de biología molecular bien conocidas. Se describen protocolos detallados para varios de estos procedimientos, incluyendo amplificación, clonación, mutagénesis, transformación y similares, por ejemplo, en

Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (complementado a partir del 2000) John Wiley & Sons, Nueva York ("Ausubel"); Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook"), y Berger y Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA ("Berger").

Además de las referencias anteriores, los protocolos para las técnicas de amplificación *in vitro*, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por Q β -replicasa, y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), útiles, por ejemplo, para amplificar sondas de ADNc descritas en el presente documento, se encuentran en Mullis et al. (1987) Patente de Estados Unidos nº 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Arnheim y Levinson (1990) C&EN 36; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81; Kwoh et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86, 1173; Guatelli et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1874; Lomell et al. (1989) J Clin Chem 35:1826; Landegren et al. (1988) Science 241:1077; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560; Barringer et al. (1990) Gene 89:117, y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13:563. Los métodos adicionales, útiles para clonar ácidos nucleicos en el contexto descrito en el presente documento incluyen Wallace et al. Patente de Estados Unidos nº 5.426.039. Se resumen métodos mejorados para amplificar ácidos nucleicos grandes mediante PCR en Cheng et al. (1994) Nature 369:684 y las referencias citadas en el mismo.

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

En lugar de sintetizar las secuencias deseadas, puede solicitarse esencialmente cualquier ácido nucleico según especificaciones de cualquiera de una diversidad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (mcrc@oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), ExpressGen, Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies, Inc. (www.operon.com), y muchas otras.

Además, puede lograrse la sustitución de restos de aminoácidos seleccionados en los polipéptidos virales mediante, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido. Por ejemplo, los polipéptidos virales con sustituciones de aminoácidos correlacionadas funcionalmente con una característica fenotípica deseable, por ejemplo, un fenotipo atenuado, adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, pueden producirse introduciendo mutaciones específicas en un segmento de ácido nucleico viral que codifica al polipéptido. Los métodos para la mutagénesis de sitio dirigido se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel, Sambrook, y Berger, anteriormente citados. Hay disponibles comercialmente numerosos kits para llevar a cabo la mutagénesis de sitio dirigido, por ejemplo, el kit de mutagénesis de sitio dirigido Chameleon (Stratagene, La Jolla), y pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante para introducir, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos descritas en la Tabla 6 o en la Tabla 17, en un segmento genómico que codifica un polipéptido de gripe A o B, respectivamente.

Ejemplos

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE pAD3000

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

Las secuencias procedentes de SV40 se amplificaron con Taq MasterMix (Qiagen) usando los siguientes oligonucleótidos, denominados en la dirección 5' a 3': polyA.1: AACAAATTGAGATCTCGGTCACCTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT (SEC ID Nº: 1) polyA.2: TATAACTGCAGACTAGTGATATCCTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTA (SEC ID Nº: 2)

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

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

Se ha usado comúnmente una variante de la cepa de virus de la gripe A adaptada al frío A/AA/6/60 como virus donante maestro para la producción de vacunas de gripe A administradas por vía nasal. Esta cepa es un virus donante maestro (VDM) ejemplar en el contexto descrito en el presente documento. Por razones de simplicidad, esta cepa A/AA/6/60 se denomina en el presente documento VDM-A. El ARN viral de VDM-A se extrajo usando el kit RNeasy mini (Qiagen) y se amplificaron los ocho fragmentos de ADNc correspondientes mediante RT-PCR usando los cebadores listados en la Tabla 1.

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

SEC ID N°	Cebador	Secuencia (5'-3')
CEBADORES DIRECTOS DE VDM-A		
3	AarI PB2 long	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC GAA AGC AGG TC
4	BsmBI-PBI	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC AAA
5	BsmBI-PA	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT ACT
6	BsmBI-NP	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TAG A
7	AarI HA-long	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC AAA AGC AGG GG
8	BsmBI-NA	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGA GTG A
9	BsmBI-M	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGT AGA T
10	BsmBI-NS	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TGA
CEBADORES INVERSOS DE VDM-A		
11	AarI PB2-long	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGT CGT TT
12	BsmBI-PB1	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
13	BsmBI-PA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
14	BsmBI-NP	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT
15	AarI HA-long	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGG TGT T
16	BsmBI-NA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAG TTT
17	BsmBI-M	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA GTT
18	BsmBI-NS	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT

- 10 Con la excepción de los segmentos genómicos de la gripe que codifican HA y PB2, que se amplificaron usando los cebadores que contenían el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Aar I, los 6 genes restantes se amplificaron con cebadores que contenían el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BsmB I. Los fragmentos de ADNc tanto de Aar I como de BsmB I se clonaron entre los dos sitios de BsmB I del vector pAD3000.
- 15 El análisis de secuenciación reveló que todos los fragmentos de ADNc clonados contenían mutaciones respecto de la secuencia consenso de VDM-A, que se introdujeron igualmente durante las etapas de clonación. Las mutaciones halladas en cada segmento génico se resumen en la Tabla 2.

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

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

Todas las mutaciones se corrigieron hacia la secuencia consenso de VDM-A usando un kit de mutagénesis de sitio dirigido QuikChange (Stratagene) y cebadores oligonucleotídicos sintéticos, tal como se muestran en la Tabla 3.

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

	HJ67	PB2A954G	5/P/gcaagctgtggaatatgcaaggc (SEC ID N°: 19)
	HJ68	PB2A954G.as	gccttgcatattccacagcttc (SEC ID N°: 20)
	HJ69	PB2G1066A	5/P/gaagtgttacgggcaatcttcaaac (SEC ID N°: 21)
PB2	HJ70	PB2G1066A.as	gttggaagattgccgtaagcacttc (SEC ID N°: 22)
	HJ71	PB2T1580A	5/P/cctgaggaggtcagtgaacac (SEC ID N°: 23)
	HJ72	PB2T1580A.as	gtgttcactgacctcctcagg (SEC ID N°: 24)
	HJ73	PB21821C	5/P/gttgttaggactctattccaac (SEC ID N°: 25)
	HJ74	PB21821C.as	gttggaatagagtccaacaaac (SEC ID N°: 26)
PB1	HJ75	PB1C1117T	gacagtaagctccgaacacaaatac (SEC ID N°: 27)
	HJ76	PB1C1117T.as	gtattgtgtcggagcttcattgc (SEC ID N°: 28)
	HJ77	PA-G742A	5/P/cgaaccgaacggctacattgagg (SEC ID N°: 29)
	HJ78	PA-G742A.as	ccctcaatgtagccgttcgggttcg (SEC ID N°: 30)
	HJ79	PA-A1163G	5/P/cagagaaggtagattgacgactg (SEC ID N°: 31)
	HJ80	PA-A1163G.as	cagtcgtcaaagctaccttctctg (SEC ID N°: 32)
PA	HJ81	PA-A1615G	5/P/cactgaccaagactgagccac (SEC ID N°: 34)
	HJ82	PA-A1615G.as	gtggctcaagtcttgggtcagtg (SEC ID N°: 34)
	HJ83	PA-T1748C	5/P/caagattaaaatgaaatggggaatg (SEC ID N°: 35)
	HJ84	PA-T1748C.as	cattccccatttcatttaattcttg (SEC ID N°: 36)
	HJ85	PA-C2229	5/P/gtacctgttttactataaaccgg (SEC ID N°: 37)
	HJ86	PA-C2230.as	ccgggtattagtagaacaaggtag (SEC ID N°: 38)
	HJ87	HA-A902C	5/P/ggaacacttgagaactgtgagacc (SEC ID N°: 39)
HA	HJ88	HA-A902C.as	gggtcacagttctcaagtgttc (SEC ID N°: 40)
	HJ89	HA-C1493T	5/P/gaatttatcacaatgtgatgaaatg (SEC ID N°: 41)
	HJ90	HA-C1493T.as	cattcatcatcacatttgtataaaattc (SEC ID N°: 42)
	HJ91	NP-C113A	5/P/gccagaatgcaactgaaatcagagc (SEC ID N°: 43)
NP	HJ92	NP-C113A.as	gctctgatttcagttcattctggc (SEC ID N°: 44)
	HJ93	NP-T1008C	5/P/ccgaatgagaatccagcacacaag (SEC ID N°: 45)
	HJ94	NP-T1008C.as	ctgtgtgtggtgattctcattcgg (SEC ID N°: 46)
	HJ95	NA-C1422T	catcaatttcattgcctatataagcttc (SEC ID N°: 47)
NS	HJ96	NA-C1422T.as	gaaagcttatataggcatgaaattgatg (SEC ID N°: 48)
	HJ97	NS-C38T	cataatggatcctaactgtgtcaagc (SEC ID N°: 49)
	HJ98	NS-C38T.as	gcttgacacagtgttaggatccattatg (SEC ID N°: 50)
PA	HJ99	PA6C375T	ggagaatagattcatcgagattggag (SEC ID N°: 51)
	HJ100	PA6C375T.as	ctccaatctcgatgaatctattctcc (SEC ID N°: 52)

EJEMPLO 3: GENERACIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE VDM-A RECOMBINANTE Y REORGANIZADO INFECCIOSO

5

Se mantuvieron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células COS7 humanas en medio Eagle modificado (MEM) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10%. Se mantuvieron células embrionarias de riñón humano (293T) en Opti-MEM I (Life Technologies) que contenía FBS al 5%. Se cocultivaron células MDCK y COS7 o 293T en placas de 6 pocillos a una relación 1:1 y se usaron las células para transfección a una confluencia de aproximadamente el 80%. Las células 293T y COS7 tienen una elevada eficacia de la transfección, pero no son permisivas para la replicación del virus de la gripe. El cultivo conjunto con células MDCK asegura una replicación eficiente de los virus recombinantes. Antes de la transfección, se reemplazaron los medios que contenían suero con medio sin suero (Opti-MEM I) y se incubaron durante 4-6 horas. La transfección del ADN de plásmido se efectuó usando TransIT-LT1 1 (Mirus) mezclando 1 µg de cada uno de los 8 ADN plasmídicos (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con 20 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de Opti-MEM I en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min seguido de la adición de 800 µl de Opti-MEM I. Entonces se añadió la mezcla de transfección a las células MDCK/293T o MDCK/COS7 cultivadas conjuntamente. Las células transfectadas se incubaron a 35 °C o 33 °C durante entre 6 horas y 24 horas, por ejemplo, durante toda la noche, y la mezcla de transfección se reemplazó con 1 ml de Opti-MEM I en cada pocillo. Después de la incubación a 35 °C o 33 °C durante 24 horas, se añadió a cada pocillo 1ml de Opti-MEM I que contenía TPCK-tripsina 1µg/ml y se incubó durante 12 horas adicionales. El virus recuperado se amplificó entonces

10

15

20

en células MDCK confluentes o se amplificó directamente en huevos de gallina embrionados. Las células MDCK en placa de 12 pocillos se infectaron con 0,2 ml de la mezcla de transfección durante 1 hora a temperatura ambiente, se retiró la mezcla y se reemplazó con 2 ml de Opti-MEM I que contenía TPCK-tripsina 1µg/ml. Las células se incubaron a 35 °C o 33 °C durante 3-4 días. Los virus amplificados se almacenaron a -80°C en presencia de estabilizante de SPG o se purificaron en placa y se amplificaron en células MDCK o en huevos de gallina embrionados.

Expresión funcional de proteínas polimerasas de VDM-A

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

Se transfectaron PB1, PB2, PA y NP o PB1, PA, NP (-PB2 como control negativo) de VDM-A en las células MDCK/293T cultivadas conjuntamente junto con un plásmido que representaba un minigenoma de EGFP de virus de la gripe A (pHW72-EGFP) (Hoffmann et al. (2000) "Ambisense" approach for the generation of Influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template Virology 15:267(2):310-7). Las células transfectadas se observaron en un microscopio de contraste de fase o en un microscopio de fluorescencia a las 48 horas después de las transfección. Como alternativa, puede emplearse citometría de flujo para detectar la expresión de EGFP.

Tal como se muestra en la Figura 2, la fluorescencia verde, que indica la expresión del minigenoma de EGFP se observó en las células transfectadas con PB2, PB1, PA y NP de VDM-A, pero no en las células transfectadas con solo tres proteínas polimerasas. Esto indicó que las proteínas polimerasas de VDM-A en pAD3000 eran funcionales.

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

Análisis de los plásmidos de VDM-A mediante experimento reorganizante de un solo gen

Se demostró que cada uno de los 8 segmentos génicos de VDM-A clonados en pAD3000 se expresaba funcionalmente en un experimento reorganizante cotransfectando un solo segmento génico de VDM-A junto con los siete segmentos complementarios de la cepa de control A/PR/8/34. Todos los plásmidos de segmento genómico individual en combinación con segmentos de control complementarios generaron virus reorganizantes infecciosos, que causaron efectos citopáticos en células MDCK infectadas, lo que indica que todos los ocho plásmidos codifican proteínas de VDM-A funcionales. Tabla 4.

Tabla 4. Recuperación de reorganizantes 7+1 mediante plásmidos

Segmento génico de virus	PB2	PB1	PA	NP
1	PMDV-A-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	PHW192-PB1	pMDV-A-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	PHW193-PA	pHW193-PA	pMDV-A-PA	pHW193-PA
4	PHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	pMDV-A-NP
5	PHW197-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	PHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	PHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA
8	PHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)
Segmento génico de virus	M	NS	HA	NA
1	PHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	PHW192-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	PHW193-PA	pHW193-PA	pHW193-PA	pHW193-PA
4	PHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP
5	PMDV-A-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	PHW198-NS	pMDV-A-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	PHW 194-HA	pHW194-HA	pMDV-A-HA	pHW194-HA
8	PHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pMDV-A-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)

Para determinar adicionalmente las restricciones de empaquetamiento del virus de la gripe A, se separó el segmento NS en dos segmentos génicos separados: uno que codificaba el segmento genómico NS1 y el otro codificando el segmento genómico NS2. Los nueve plásmidos que incorporaban los segmentos genómicos de la gripe A se transfectoron en células MDCK/COS tal como se describe anteriormente, y los virus recombinantes se amplificaron en huevos de gallina embrionados antes de su titulación en células MDCK. Se observó un tamaño de placas reducido para el sistema de nueve plásmidos en comparación con el sistema de ocho plásmidos descrito anteriormente. El análisis mediante RT-PCR demostró que solo estaba presente el segmento NS2 en los viriones, y que no estaba empaquetado el segmento génico NS1.

Recuperación de VDM-A y virus reorganizantes 6:2

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, tres días después de la transfección bien con los 8 plásmidos de VDM-A (recombinantes), o con los plásmidos que incorporaban los 6 genes internos de VDM-A, y HA y NA procedentes de A/PR/8/34 (reorganizante 6:2), se usaron los sobrenadantes de cultivo para infectar nuevas células MDCK, y las células infectadas se incubaron a 33°C durante tres días en presencia de 1 µg/ml de TPCK-tripsina. Se observó el efecto citoplásmico del virus recombinante en células MDCK usando un microscopio. La expresión de hemaglutinina viral se controló usando un ensayo de hemaglutinina (HA) convencional. Los ensayos de HA se efectuaron mezclando 50 µl de sobrenadantes de cultivo diluidos en serie 2 veces con 50 µl de glóbulos rojos sanguíneos de gallina al 1% en placas de 96 pocillos. Se detectó un título de HA de aproximadamente 1:254-1:1024 para los virus amplificados procedentes bien de los 8 plásmidos de VDM-A transfectados, o del virus reorganizante 6:2. La reacción de transfección que usa los 8 plásmidos de A/PR/8/34 obtenida del Dr. E. Hoffman se usó como control positivo. Se produjeron virus de la gripe infecciosos a partir de estas tres reacciones de transfección, según se indica en la Tabla 5.

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

Segmento génico de virus	A/PR/8/34 (H1N1)	rVDM-A(H2N2)	reorganizante 6:2
1	pHW191-PB2 (AD731)	pMDV-A-PB2 nº2 (AD760)	pMDV-A-PB2 nº2 (AD760)
2	pHW192-PB1(AD732)	pMDV-A-PB1 (AD754)	pMDV-A-PB1 (AD754)
3	pHW193-PA (AD733)	pMDV-A-PA (AD755)	pMDV-A-PA (AD755)
4	pHW195-NP (AD735)	pMDV-A-NP nº 1 (AD757)	pMDV-A-NP nº 1 (AD757)
5	pHW197-M (AD737)	pMDV-A-M (AD752)	pMDV-A-M (AD752)
6	pHW198-NS (AD738)	pMDV-A-NS (AD750)	pMDV-A-NS (AD750)
7	pHW194-HA (AD734)	pMDV-A-HA (AD756)	pHW194-HA (AD734)
8	pHW-196-NA(AD735)	pMDV-A-NA nº 4 (AD759)	pHW196-NA (AD736)
CPE	+	+	+

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

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

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

La cepa de vacuna del virus de la gripe VDM-A tiene varios fenotipos relevantes para la producción de vacunas, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas: adaptación al frío (ca), sensibilidad a la temperatura (ts) y atenuación (att). La comparación de secuencia de la cepa VDM-A con la cepa A/AA/6/60 wt virulenta no-ts reveló diferencias mínimas de 17 nucleótidos entre estas dos cepas (Tabla 6). Varios de los cambios en la secuencia de VDM-A son únicos para

esta cepa en comparación con todos los virus de la gripe de tipo A disponibles en la base de datos de GenBank, lo que sugiere que una o más de estas sustituciones de aminoácidos está relacionada funcionalmente con el fenotipo (o los fenotipos) att, ca y ts. El cambio de un solo aminoácido en PB2⁸²¹ fue la única posición de nucleótido que se había comunicado previamente como determinante en el fenotipo ts de VDM-A (Subbarao et al. (1995) Addition of Temperature-Sensitive Missense Mutations into the PB2 Gene of Influenza A Transfectant Viruses Can Effect an Increase in Temperature Sensitivity and Attenuation and Permits the Rational Design of a Genetically Engineered Live Influenza A Virus Vaccine J. Virol. 69:5969-5977).

Para determinar con precisión las sustituciones mínimas implicadas en los fenotipos de VDM-A, se cambiaron individualmente los nucleótidos en el clon de VDM-A que diferían de A/AA/6/60 de wt por aquellos de A/AA/6/60 de wt (es decir, "se revirtieron"). Cada segmento génico revertido se introdujo entonces en células hospedadoras en combinación con segmentos complementarios de VDM-A para recuperar los reorganizantes de un solo gen. Además, el segmento génico revertido y el segmento correspondiente de VDM-A también pueden transfectarse en combinación con segmentos procedentes de otras cepas de tipo silvestre, por ejemplo, la cepa A/PR/8/34, para evaluar la contribución de cada segmento génico a los fenotipos del virus. Usando el sistema de plásmido de VDM-A recombinante descrito anteriormente, se llevó a cabo mutagénesis de sitio dirigido para modificar adicionalmente los seis genes internos para producir un reorganizante no-ts. Se introdujeron un total de 15 mutaciones de sustitución de nucleótidos en los seis plásmidos de VDM-A para representar el genoma de tipo silvestre de A/AA/6/60 (rWt, Flu064) tal como se lista en la Tabla 6. Se mantuvieron y transfectaron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células COS-7 tal como se describe anteriormente. El virus recuperado se pasó en células MDCK una vez, seguido de amplificación en las cavidades alantoicas de huevos de pollo embrionados. La transfección y el crecimiento de virus en MDCK y huevos se llevaron a cabo a 33 °C, una temperatura permisiva para virus tanto ca como wt para minimizar cualquier presión selectiva de temperatura. El genotipo del virus se confirmó mediante análisis de secuencia de fragmentos de ADNc amplificados a partir de ARN viral.

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

Segmento de ARN	Posición de base (aminoácido)	E10SE2	VDM-A	rWT (Flu044)
PB2	141	A.	G	A.
	821 (265)	A (Asn)	G(Ser)	A.
	1182	A.	T	T
	1212	C	T	T
	1933	T	C	T
PB1	123	A.	G	G
	1195 (391)	A (Lys)	G (Glu)	A.
	1395 (457)	G (Glu)	T (Asp)	G
	1766 (581)	A (Glu)	G (Gly)	A.
	2005 (661)	G (Ala)	A (Thr)	A.
	2019	C	T	C
PA	20	T	C	T
	1861 (613)	A (Lys)	G (Glu)	G
	2167/8 (715)	TT (Leu)	CC (Pro)	TT
NP	146 (34)	A (Asp)	G (Gly)	G
	1550	'5A'	'6A'	'6A'
M	969 (M2-86)	G (Ala)	T (Ser)	G
NS	483 (NS1-153)	G (Ala)	A (Thr)	G
Los números en negrita representan las diferencias entre rVDM-A y rWt. Las palabras en negrita (15) son los cambios entre rVDM-A y rWt.				

Las características fenotípicas se determinaron mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se han descrito anteriormente en la Patente de Estados Unidos 6.322.967 de Parkin titulada "Recombinant tryptophan mutants of influenza," que se incorpora al presente documento en su totalidad. En resumen, la sensibilidad a la temperatura de los virus recombinantes se determinó mediante ensayo en placa en células MDCK a 33, 38 y 39 °C. Se infectaron las células MDCK en placas de 6 pocillos con 400 µl de virus diluido en serie 10 veces y se adsorbieron a temperatura ambiente durante 60 min. Se retiraron los inóculos y se reemplazaron con L15/MEM 1x que contenía agarosa al 1% y TPCK-tripsina 1 µg/ml. Las células infectadas se incubaron a 33 °C en una incubadora de CO₂ o en contenedores estancos al agua que contenían CO₂ al 5% sumergidos en baños de agua mantenidos a 38 ± 0,1 °C o 39 ± 0,1 °C (Parkin et al. (1996) Temperature sensitive mutants of influenza A virus generated by reverse genetics and clustered charged to alanine mutagenesis. Vir. Res. 46:31-44). Después de tres días de incubación, se inmunotifieron las monocapas usando anticuerpos policlonales de pollo anti-VDM y se

numeraron las placas. Se compararon los recuentos de placas a cada una de las temperaturas para evaluar el fenotipo ts de cada virus y se llevó a cabo cada ensayo un mínimo de tres veces. La temperatura de extinción se definió como la temperatura más baja que tenía una reducción del título de 100 veces o mayor en comparación a 33 °C.

El virus infeccioso obtenido a partir de las células COS-7/MDCK cultivadas conjuntamente con los ocho plásmidos (pMDV-PB2, pMDV-PB1, pMDV-PA, pMDV-NP, pMDV-HA, pMDV-NA, pMDV-M, y pMDV-NS) se amplificó en huevos embrionados de gallina, y se demostró que mostraban el fenotipo ts característico de VDM-A no recombinante de procedencia biológica (Tabla 7). Ni VDM-A ni rVDM-A formaron placas distinguibles a 39 °C, aunque ambos formaron placas fácilmente visualizables a 33 °C.

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

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

*Indica reducción en el tamaño de la placa en comparación con rWt.
[†]El subrayado indica que no se detectaron placas a una dilución en serie de 10⁻⁴

Para efectuar un análisis sistemático y detallado de la base genética del fenotipo ts de VDM-A, se utilizaron para la comparación las secuencias de varias cepas no-ts, no-att de wt de A/AA/6/60 con diferencias de 17-48 nucleótidos respecto de A/AA/6/60 de ca, incluyendo el aislado altamente relacionado, A/AA/6/60 E10SE2 de wt. Existen un total de 19 diferencias de nucleótidos entre E10SE2 y VDM-A (Tabla 6). Se demostró que E10SE2 era no-ts (Tabla 7) y no-att en hurones. Para generar un virus recombinante no-ts, se alteraron los plásmidos de VDM-A mediante mutagénesis de sitio dirigido para incorporar 15 de las 19 diferencias que representaban 10 cambios de aminoácidos. Cuatro de las posiciones de nucleótidos, PB2-1182, 1212, PB1-123, y NP-1550, que diferían entre VDM-A y E10SE2 no se alteraron respecto de la secuencia de VDM-A, ya que estos nucleótidos se observaron en otros aislados no-ts de A/AA/6/60 y, por lo tanto, no se esperaba que tuviesen un papel en la expresión del fenotipo ts (Herlocher et al. (1996) Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. Virus Research 42:11-25). El virus recombinante (rWt, Flu064), que codificaba los 15 cambios de nucleótidos, se obtuvo de las células COS-7/MDCK cultivadas conjuntamente transfectadas con un conjunto de 8 plásmidos, pWt-PB2, pWt-PB1, pWt-PA, pWt-NP, pWt-M, pWt-NS, pMDV-HA, y pMDV-NA. El análisis de secuenciación indicó que rWt contenía los cambios genéticos designados y era no-ts a 39 °C, idéntico al A/AA/6/60 de wt de procedencia biológica. Estas observaciones demostraron que el fenotipo ts se mapeaba a un subconjunto de estos 15 cambios de nucleótidos.

Contribución de los seis segmentos con sentido internos al fenotipo ts del virus

Se evaluó el efecto de cada segmento génico de wt en el fenotipo ts de VDM-A creando reorganizantes de un solo gen recombinantes (Tabla 7). La introducción de PB2 de wt en rVDM-A dio como resultado un virus que solo era no-ts a 38 °C; sin embargo, siguió siendo ts a 39 °C. La reducción en el título de virus a 38°C y 39 °C (en relación a 33 °C) fue de 0,6 log₁₀ y 2,7 log₁₀, respectivamente, medido mediante ensayo de placa en células MDCK. El reorganizante que contenía el segmento génico de PB1 de wt era no-ts, respecto de su capacidad para formar placas tanto a 38 como a 39°C. El tamaño de la placa de este recombinante, sin embargo, se vio influenciado por el aumento de la temperatura y se redujo significativamente a 39°C en comparación con rWt. La introducción del segmento génico de NP de wt en rVDM-A dio como resultado un virus que también era no-ts a 38 °C, pero a diferencia del recombinante de PB2 de wt, el virus que contenía el segmento génico de NP de ts no formó placas a 39 °C. La introducción de segmentos génicos de PA, M o NS de wt de manera independiente en rVDM-A no alteró el fenotipo ts, lo que indica que estos tres segmentos génicos tenían un papel mínimo en el mantenimiento de este fenotipo.

Debido a que ni PB1 de wt, PB2 de wt o NP de wt expresados individualmente en el origen de VDM-A pudieron crear una placa de manera eficiente y perfiles de tamaño de placa idénticos a rWT no-ts, estos segmentos génicos se introdujeron en VDM-A en varias combinaciones. La combinación de PB1 de wt y PB2 de wt dio como resultado un virus que era no-ts tanto a 38 como a 39 °C (Tabla 7). Aunque el tamaño de la placa era mayor que el de cualquiera de los reorganizantes de un solo gen, fue significativamente menor que el de rWt. La combinación triple de PB1/PB2/NP de wt en rVDM-A dio como resultado un virus que era similar o idéntico a rWT en cuanto a su eficiencia y tamaño de placa a 39 °C. Por lo tanto, mientras que los segmentos génicos de PB2, PB1 y NP DE wt solo revirtieron parcialmente el fenotipo ts cuando se introdujeron individualmente, la combinación de los tres segmentos génicos de wt fue capaz de revertir completamente el fenotipo ts a un comportamiento no-ts idéntico al de rWt.

Para determinar si estos 3 segmentos génicos eran capaces de impartir el fenotipo ts característico de VDM-A a rWt, se introdujeron los seis segmentos génicos internos procedentes de VDM-A en rWt de manera individual o en combinación. La introducción de los segmentos génicos PB1, PB2, o NP individualmente en rWt dio como resultado una reducción del título de virus a 38 °C y una reducción mayor a 39 °C, sin embargo, ninguno de estos reorganizantes de un solo gen estaba tan restringido a alta temperatura como rVDM-A (Figura 10). Los segmentos génicos PA, M y NS procedentes de VDM-A no influenciaron el fenotipo no-ts de rWt. De manera consistente con los reorganizantes anteriores, se demostró que la introducción de ambos genes PB1 y PB2 de VDM-A en la estructura de rWt aumentó en gran medida el fenotipo ts del virus a 38 °C; sin embargo, la reversión completa del fenotipo ts del virus requirió la adición del gen NP. Por lo tanto, los segmentos génicos de PB1, PB2 y NP procedentes de VDM-A fueron importantes para conferir el fenotipo ts completo.

Mapeo del locus genético que determinó el fenotipo ts de VDM-A.

Se abordaron sistemáticamente las diferencias específicas entre los segmentos génicos PB1, PB2 y NP de rWt y rVDM-A para identificar aquellos cambios que desempeñaron un papel significativo en el fenotipo ts. El gen NP de rVDM-A difirió de NP de rWt solo en el nucleótido 146 (G34D, Tabla 6). El gen de PB2 de rVDM-A difirió del de rWt en tres sitios, pero solo el nucleótido 821 dio como resultado un cambio de aminoácido (N265S, Tabla 6) y representó probablemente el locus de ts localizado en el segmento génico de PB2. El gen de PB1 de VDM-A difirió de PB1 de wt en 6 posiciones de nucleótidos, de las cuales 4 fueron cambios codificantes (Tabla 6). Se sustituyó cada una de las sustituciones de resto de aminoácido de wt individualmente en el segmento génico de PB1 de rVDM-A para evaluar su papel en el fenotipo ts. 1395G (Glu-457) y 2005G (Ala) no afectaron al fenotipo ts de VDM-A. 1195A (Lys-391) y 1766A (Glu-581) dieron cada una como resultado una ligera reducción en el fenotipo ts a 38 °C, pero no tuvieron efecto a 39 °C (Tabla 8). Estos datos indicaron que 1195A y 1766A fueron probablemente los locus de ts en el segmento génico de PB1. Sin embargo, la combinación tanto de 1195A como de 1766A no produjo un fenotipo ts similar al de PB1 de wt (Tabla 6). La adición de 2005G pero no de 1395A a PB1-1195A/1766A disminuyó adicionalmente el fenotipo ts del virus a 39 °C, demostrando que 2005A tenía también un papel en la expresión del fenotipo ts especificada por el segmento PB1 de VDM-A.

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

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

*Indica reducción en el tamaño de la placa en comparación con rWt.

[†]El subrayado indica que no se detectaron placas a una dilución en serie de 10⁻⁴.

Se introdujeron entonces mutaciones individuales de PB1 junto con PB2 de wt y NP de wt en rVDM-A. Los reorganizantes de PB2/NP de wt y rVDM-A fueron no-ts a 38 °C y tenían una reducción de título de 1,25 log₁₀ a 39 °C pero su tamaño de placa estaba muy reducido en comparación con rWt. La adición de PB1-1195A o 1766A no cambió significativamente el fenotipo del reorganizante de PB2/NP de wt. Solo la combinación de PB 1-1195A y 1766A, junto con un PB2 de wt y NP de wt, dio como resultado un virus que tenía el mismo fenotipo no-ts que PB1/PB2/NP de wt y el reorganizante rVDM-A (Tabla 8). La adición de PB1-1395G o 2005G a PB1-1766/PB2/NP de

et no convirtió al virus a un fenotipo no-ts característico de rWt. Estos datos, por lo tanto, demostraron que los cuatro aminoácidos distribuidos en los tres genes PB1, PB2 y NP podían revertir por completo el fenotipo ts de MDV-A.

Restricción de células hospedadoras de VDM-A y virus reorganizantes

- 5 Además de los fenotipos de sensibilidad a la temperatura y atenuación mostrados por el virus VDM-A y virus reorganizantes con uno o más segmentos procedentes de VDM-A tal como se han descrito anteriormente, el virus VDM-A mostró restricción de célula hospedadora tal como se indicó por el crecimiento reducido en células Per.C6 en relación al crecimiento en células MDCK. Los virus VDM-A y reorganizantes con segmentos PB1 y PB2 procedentes de VDM-A mostraron un crecimiento significativamente reducido en células Per.C6 en relación a su crecimiento en células MDCK, tal como se muestra en la Figura 20A y B.

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

- 15 Para determinar si los cinco aminoácidos identificados en los segmentos génicos PB1, PB2 y NP de VDM-A podrían reproducir los fenotipos ts y att de VDM-A, se introdujeron PB1-391E, 581G, 661T, PB2-265S y NP-34G en una cepa de virus de tipo silvestre divergente (A/PR/8/34; "PR8"), y el virus resultante mostró una reducción del título de virus de 1,9 log₁₀ a 38 °C y una reducción de 4,6 log₁₀ a 39 °C, que fue muy similar a la de rVDM-A (Figura 11).

- 20 La comparación de secuencia entre los genes PB1, PB2 y NP de A/AA/6/60 ca (VDM-A) y A/PR/8/34 reveló que los cuatro aminoácidos sustituidos identificados en los genes de PB1 y PB2 de VDM-A son únicos. NP³⁴ está conservado entre VDM-A y PR8. Por lo tanto, los tres sitios de ts, PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G) y PB1⁶⁶¹ (A661T), identificados en el gen PB1 de VDM-A se introdujeron en PB1 de A/PR/8/34 y PB2²⁶⁵ (N265S) se introdujo en PB2 de A/PR/8/34 mediante mutagénesis de sitio dirigido. Las mutaciones introducidas en los genes PB1 y PB2 se verificaron mediante análisis de secuenciación. Los pares de cebadores usados para la reacción de mutagénesis se listan en la Tabla 9. Estos virus se muestran esquemáticamente en la Figura 16.

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

HJ240	PR8-PB1A1195G	5' GAAAGAAGATTGAAGAAATCCGACCGCTC (SEC ID N°: 79)
HJ241	PR8-PB1A1195G.as	5' GAGCGGTCGGATTTCTTCAATCTTCTTTC (SEC ID N°: 80)
HJ242	PR8-PB1A1766G	5' GAAATAAAGAACTGTGGGGGCAAACCCGTTCC (SEC ID N°: 81)
HJ243	PR8-PB1A1766G.as	5' GGAACGGGTTTGCCCCACAGTTTCTTTATTTTC (SEC ID N°: 82)
HJ244	PR8-PB1G2005A	5' GTATGATGCTGTTACAACAACACACTC C (SEC ID N°: 83)
HJ245	PR8-PB1G2005A.as	5' GGAGTGTGTTGTTGTAACAGCATCATAC (SEC ID N°: 84)
HJ246	PR8-PB2A821G	5' ATTGCTGCTAGGAGCATAGTGAGAAGAGC (SEC ID N°: 85)
HJ247	PR8-PB2A821G.as	5' GCTCTTCTCACTATGCTCCTAGCAGCAAT (SEC ID N°: 86)

- 30 Para examinar si las mutaciones de ts introducidas en los genes PB1 y PB2 de PR8 conferían el fenotipo ts *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de minigenoma. El indicador de minigenoma de la gripe, denominado pFlu-CAT, contenía el gen CAT de sentido negativo clonado bajo el control del promotor de pol I. La expresión de la proteína CAT dependía de la expresión de las proteínas de la gripe PB1, PB2, PA, y NP.

- 35 En resumen, se transfectaron células Hep-2 con 1 µg de cada uno de PB1, PB2, PA, NP y minigenoma de pFlu-CAT mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de una incubación durante toda la noche (aproximadamente 18 horas) a 33 °C o 39 °C, se analizaron los extractos celulares respecto de la expresión de proteína CAT mediante el kit de ELISA para CAT (Roche Bioscience). Se midió el nivel de ARNm de CAT mediante ensayo de extensión de cebador. A las 48 horas después de la transfección, se extrajo el ARN celular total mediante reactivo TRIzol (Invitrogen) y se mezcló 1/3 del ARN con un exceso de cebador de ADN (5'-ATGTTCTTTACGATGCGATTGGG (SEC ID N°: 89) marcado en su extremo 5' con [γ-³²P]-ATP y T4 polinucleótido cinasa en 6µl de agua. Después de desnaturar a 95 °C durante 3 min, se llevó a cabo la extensión de cebador después de la adición de 50 U de transcriptasa inversa superscript (Invitrogen) en el tampón de reacción proporcionado con la enzima que contenía 0,5 mM de dNTP durante 1 hora a 42 °C. Los productos de transcripción se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% que contenían urea 8 M en tampón TBE y se detectaron mediante autorradiografía.

- 45 Tal como se muestra en la Fig. 12A y B, el gen PB1 que portaba las tres sustituciones de aminoácidos (PR8-3s), PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G) y PB1⁶⁶¹ (A661T), tenían actividad reducida a 33°C en comparación con el control de PR8. Se observó una reducción mayor en la expresión de proteína CAT (Fig. 12A) para este mutante a 39 °C, indicando que el gen PB1 con los tres sitios de VDM-A ts introducidos mostró una replicación sensible a la temperatura en este ensayo *in vitro*. La introducción de PB2²⁶⁵ (N265S) en PR8 tuvo un efecto muy pequeño en su actividad a temperaturas tanto permisivas (33 °C) como no permisivas (39 °C). La combinación tanto de PB1-3s como de PB2-1s dio como resultado una reducción mayor en la actividad de proteína (PR8-4s), que pareció ser incluso más ts que VDM-A. Tal como se esperaba, se detectó una actividad de bajo nivel (15%) en células transfectadas con los genes PB1, PB2, PA, NP procedentes de VDM-A a 39 °C en comparación con A/AA/6/60 de wt (wt A/AA).

Los virus mutantes de PR8 se generaron y recuperaron tal como se describió anteriormente. En resumen, se transfectaron células COS-7 y MDCK cultivadas conjuntamente con ocho plásmidos que codificaban los genes HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M y NS de PR8 procedentes de PR8. Para producir un virus que portaba cuatro locus de ts (PR8-4s), se usaron PB1-3s que contenía tres cambios en PB1 en las posiciones de nucleótidos 1195 (K391E), 1766 (E581G) y 2005 (A661T) y PB1-1s que contenía un cambio en PB2 en la posición 821 (N265S). Además, También se recuperaron por separado los virus de PR8 que portaban bien tres mutaciones en PB1 (PR8-3s) o una mutación en PB2 (PR8-1s). Estos virus se muestran esquemáticamente en la Figura 16. Los cuatro virus PR8 mutantes recombinantes crecieron a títulos muy elevados en huevos embrionados, alcanzando un título de 9,0 log₁₀ ufp/ml o mayor, tal como se muestra en la Tabla 10.

Para examinar la síntesis de proteínas virales en células infectadas, se infectaron células MDCK con un virus a una MOI de 5 y se marcaron las células con ³⁵S-Trans a las 7 horas después de la infección durante 1 hora. Se sometió el lisado de células marcadas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 1,5% que contenía SDS y se autorradiografió. La síntesis de proteínas también se estudió mediante transferencia de Western. Las células infectadas por virus se recogieron a las 8 horas después de la infección y se sometieron a electroforesis en un gel de gradiente al 4-15%. Se sondó la transferencia con anticuerpo anti-M1 o anticuerpo policlonal de pollo anti-VDM-A, seguido de incubación con anticuerpo secundario conjugado a HRP. Las bandas de proteínas conjugadas a anticuerpo se detectaron mediante sistema de detección quimioluminiscentes (Invitrogen) seguido de exposición a película de rayos X.

Tal como se muestra en la Fig. 19, todos tenían un nivel similar de síntesis de proteínas a 33 °C, sin embargo, a 39 °C, el nivel de síntesis de proteínas se redujo ligeramente para PR8-1s, pero se redujo en gran medida en células infectadas con PR8-3s y PR8-4s. Los análisis de transferencia de Western también mostraron síntesis de proteínas reducida en el orden de PR8-4s>PR8-3s>PR8-1s. Por lo tanto, la replicación reducida de los mutantes de ts era probablemente el resultado de su replicación reducida a temperaturas no permisivas.

La sensibilidad a la temperatura de los virus mutantes de PR8 se determinó mediante ensayo en placa en células MDCK a 33 °C, 37 °C, 38 °C y 39 °C. Los virus recuperados se amplificaron en huevos embrionados y se introdujeron en células, tal como se describe anteriormente. Después de la incubación de células infectadas por virus durante tres días a las temperaturas indicadas, se inmunotifieron monocapas de células usando anticuerpos policlonales de pollo anti-VDM y se numeraron las placas. Los recuentos de placas obtenidos a cada una de las temperaturas se compararon para evaluar el fenotipo ts de cada virus. La temperatura de extinción se definió como la temperatura más baja que tenía una reducción del título de 100 veces o mayor en comparación a 33 °C.

Tal como se muestra en la Tabla 10 y en la Fig. 17, todos los mutantes se replicaron bien a 33 °C, aunque se observó una ligera reducción en el título de virus. A 38 °C, se observó una reducción significativa en el título de virus para todos los mutantes. A 39 °C, se observó una reducción del título de virus mayor de 4,0 log₁₀ para los virus que portaban los tres locus de ts en el gen PB1 (PR8-3s y PR8-4s). PR8-1s también fue ts a 39 °C. El fenotipo ts de PR8-4s fue muy similar al de VDM-A, que tuvo una reducción de 4,6 log₁₀ a 39 °C en comparación con 33 °C. Aunque los tres mutantes de PR8 no tuvieron una reducción del título de virus mayor de 2,0 log₁₀ a 37 °C, su morfología de placa fue diferente de la de aquellos a 33 °C. Tal como se muestra en la Fig. 18, el tamaño de la placa para cada mutante se redujo solo ligeramente a 33 °C en comparación con PR8. Se observó una reducción significativa en el tamaño de placa a 37 °C para PR8-3s y mayor para PR8-4s. PR8-1s no tuvo una reducción del tamaño de placa significativa a 37 °C. A 39 °C, solo unas pocas placas de tamaño cuidadosamente seleccionado se observaron tanto para PR8-3s como para PR8-4s. Se observó un tamaño de placa de aproximadamente un 30% del de PR8 de wt para PR8-1s.

Tabla 10. Sensibilidad a la temperatura de PR8 con el locus de ts introducido. Título viral (log₁₀ ufp/ml)

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

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

Se examinó la atenuación de los virus PR8 mutantes en hurones. En resumen, se usaron hurones macho de 9-10 semanas de edad para evaluar la replicación del virus en el tracto respiratorio de un hospedador animal. Se alojaron individualmente los hurones y se les inoculó 8,5 log₁₀ ufp de virus por vía intranasal. Tres días después de la infección, se sedó a los hurones con ketamina-HCL, se recogieron los pulmones y los cornetes nasales (NT). Los homogenizados de tejido pulmonar se diluyeron en serie y se titularon en huevos de gallina embrionados de 10 días de edad. El título de virus (log₁₀EID₅₀/ml) en los pulmones se calculó mediante los métodos de Karber. La replicación del virus en NT se determinó mediante ensayo en placa y se expresó como log₁₀ ufp/ml.

Los niveles de replicación del virus en pulmones y cornetes nasales se midieron mediante EID50 o ensayos de placa (Tabla 11). Tres días después de la infección, PR8 se replicó a un nivel de $5,9 \log_{10}$ EID50/gramo de tejido pulmonar. Sin embargo, PR8-1s mostró una reducción en la replicación de $3,0 \log_{10}$ de pulmones de hurón y se detectó una replicación muy baja para PR8-3s. No se detectó replicación para PR8-4s, que se estudió en dos grupos de virus infectados con virus obtenidos independientemente. El límite de detección de virus en los pulmones de hurón mediante ensayo de EID50 es de $1,5 \log_{10}$ y por lo tanto, se asignó un título de $1,5 \log_{10}$ EID50 para PR8-4s. Como control, VDM-A no se replicó en pulmones de hurón y A/AA/6/60 de wt se replicó hasta un título de $4,4 \log_{10}$. La replicación del virus en los cornetes nasales (NT) se examinó mediante ensayo de placa en células MDCK. PR8 se replicó hasta un título de $6,6 \log_{10}$ ufp/g en la nariz. Solo se observaron ligeras reducciones en el título viral para PR8-1s y PR8-3s. Se observó una reducción de $2,2 \log_{10}$ para PR8-4s (A), mientras que se observó una reducción de $4,3 \log_{10}$ para PR8-4s (B), que portaba un cambio en el gen PB1 (E390G). La replicación reducida en gran medida de PR8-4s (B) se correlaciona bien con su fenotipo ts a 37°C . En este caso se usó una dosis infecciosa de $8,5 \log_{10}$ ufp en lugar de la de $7,0 \log_{10}$ ufp que se usó normalmente para evaluar el fenotipo de atenuación de vacunas de la gripe procedentes de VDM-A. Este resultado indicó que PR8 que portaba los cuatro locus de ts procedentes de VDM-A estaba atenuado para replicación en el tracto respiratorio inferior de hurones.

Tabla 11. Replicación de mutantes de PR8 en hurones

Virus	Hurones	Dosis ($\log_{10}$ ufp)	Título de virus en pulmones ($\log_{10}$ EID50/g $\pm$ DT)	Título de virus en cornetes nasales ($\log_{10}$ /g $\pm$ DT)
PR8	4	8,5	$5,9 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,1$
PR8-1s	4	8,5	$3,8 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,2$
PR8-3s	4	8,5	$1,7 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,3$
PR8-4s (A)	4	8,5	$1,5 \pm 0,0^a$	$4,6 \pm 0,2$
PR8-4s (B) ^b	4	8,5	$1,5 \pm 0,0$	$2,3 \pm 0,3$
VDM-A	4	8,5	$1,5 \pm 0,0$	$4,6 \pm 0,1$
Wt A/AA	4	8,5	$4,4 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$
no se detectó virus y se asignó un título de $1,5 \log_{10}$ EID50/g				
El virus contiene un cambio adicional en PB1-1193 (E390G)				

En los ensayos tanto de ts como de att, el mutante de PR8 mostró fenotipos tanto ts como att que fueron muy similares a los de VDM-A. Estos datos indican que la introducción de las sustituciones de aminoácidos únicas del VDM-A en una cepa de virus de la gripe divergente da como resultado un virus que muestra los fenotipos sensibles a la temperatura y atenuados deseables para producir, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas. Además, el virus PR-8 ts, att creció a un título elevado, lo que lo hizo adecuado para su uso como virus donante maestro para la producción de vacunas de gripe vivas atenuadas o inactivadas. Estos resultados indican que las cinco mutaciones de VDM-A: PB1-391E, PB1-581G, PB1-661T, PB2-265S, y NP-34G pueden conferir los fenotipos ts y att a cualquier cepa de gripe A. De manera similar, pueden producirse nuevas cepas B ts y att adecuadas para la producción de vacunas introduciendo las mutaciones de la cepa VDM-B en virus de la gripe de cepa B. Además de producir vacunas de virus vivas atenuadas, la introducción de estas mutaciones en cepas donantes dará lugar a la producción de vacunas inactivadas más seguras.

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

Se extrajo el ARN viral de una variante adaptada al frío de gripe B/Ann Arbor/1/66 (ca/Master Ann Arbor/1/66 P1 Aviron 10/2/97), una cepa donante maestra de gripe B (MDV-B) ejemplar, a partir de $100 \mu\text{l}$ de fluido alantoico de huevos embrionados infectados usando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), y se eluyó el ARN en $40 \mu\text{l}$ de H_2O . Se efectuó la RT-PCR de los segmentos genómicos usando el kit de RT-PCR One Step (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo proporcionado, usando $1 \mu\text{l}$ de ARN extraído para cada reacción. La reacción de RT se llevó a cabo durante 50 min a 50°C , seguido de 15 min a 94°C . La PCR se llevó a cabo durante 25 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, y 72°C durante 3 min. Los genes de P se amplificaron usando cebadores específicos de segmento con sitios de BsmBI que dieron como resultado la generación de dos fragmentos (Tabla 12).

Tabla 12. Cebadores de RT-PCR para la amplificación de los 8 ARNv de gripe B/Ann Arbor/1/66 ca

	Cebador directo	Cebador inverso
PB1	Bm-PB1b-1: (SEC ID N°: 53)	Bm-PB1b-1200R: (SEC ID N°: 54)
[1A]	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCGGAGCCTTTAAGATG	TATTCGTCTCGATGCCGTCTCTCTTCATTGAAGAATGG
PB1	Bm-PB1b-1220: (SEC ID N°: 55)	Bm-PB1b-2369R: (SEC ID N°: 56)
[1B]	TATTCGTCTCGGCATCTTTGTGCGCCTGGGATGATGATG	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCCTT
PB2	Bm-PB2b-1: (SEC ID N°: 57)	Bm-PB2b-1145R: (SEC ID N°: 58)
[2A]	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCGGAGCGTTTCAAGATG	TATTCGTCTCTCTCATTTTGCTCTTTTAAATATTCGCC
PB2	Bm-PB2b-1142: (SEC ID N°: 59)	Bm-PB2b-2396R: (SEC ID N°: 60)
[2B]	TATTCGTCTCATGAGATGGAAAAAATACTAATAAATTCAGC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCATT
PA	Bm-Pab-1: (SEC ID N°: 61)	Bm-Pab-1261R: (SEC ID N°: 62)
[3A]	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCGGTGCGTTTGA	TATTCGTCTCCAGGGCCCTTTTACTTGTGAGAGTGC
PA	Bm-Pab-1283: (SEC ID N°: 63)	Bm-Pab-2308R: (SEC ID N°: 64)
[3B]	TATTCGTCTCTCCTGGATCTACCAGAAATAGGGCCAGAC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGTCGATT
HA	VDM-B 5'BsmBI-HA: (SEC ID N°: 65)	VDM-B 3'BsmBI-HA: (SEC ID N°: 66)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCAGAGCATTCTTAATATC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTC
NP	Ba-NPb-1: (SEC ID N°: 67)	Ba-NPb-1842R: (SEC ID N°: 68)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCAGCATTCTTCTTGT	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACACAGCATTTTT
NA	VDM-B 5'BsmBI-NA: (SEC ID N°: 69)	VDM-B 3'BsmBI-NA: (SEC ID N°: 70)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCAGAGCATCTTCTCAAAAC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTCAG
M	VDM-B 5'BsmBI-M: (SEC ID N°: 71)	VDM-B 3'BsmBI-M: (SEC ID N°: 72)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCAGCATCTTCTTAAATG	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGACATTTTCCAG
NS	VDM-B 5'BsmBI-NS: (SEC ID N°: 73)	VDM-B 3'BsmBI-NS: (SEC ID N°: 74)
	TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAAGCAGAGATTGTTTAGTC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGATTTTTAT

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

Clonación de plásmidos

Se aislaron fragmentos de PRC, se digirieron con *Bsm*BI (o *Bsa*I para NP) y se insertaron en pAD3000 (un derivado de pHW2000 que permite la transcripción de ARNv de sentido negativo y de ARNm positivo) en el sitio de *Bsm*BI tal como se ha descrito anteriormente. Se secuenciaron de dos a cuatro de cada plásmido resultante y se compararon con la secuencia consenso de VDM-B basándose en la secuenciación directa de los fragmentos de RT-PCR. Se "repararon" los plásmidos que tenían sustituciones de nucleótidos que daban como resultado cambios de aminoácidos diferentes de la secuencia consenso bien mediante clonación de plásmidos o mediante la utilización del kit Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA). Los plásmidos de B/Ann Arbor/1/66 resultantes se denominaron pAB121-PB1, pAB122-PB2, pAB123-PA, pAB124-HA, pAB125-NP, pAB126-NA, pAB127-M, y pAB128-NS. Usando este sistema de transcripción bidireccional se producen intracelularmente todos los ARN y proteínas virales, dando como resultado la producción de virus de la gripe B infecciosos (Figura 4).

Cabe destacar que pAB121-PB1 y pAB124-HA tenían 2 sustituciones silentes de nucleótidos y pAB128-NS tenía 1, en comparación con la secuencia consenso (Tabla 13). Estos cambios de nucleótidos no dan como resultado alteraciones de aminoácidos, y no se prevé que afecten al crecimiento y rescate de virus. Se han mantenido estas sustituciones silentes para facilitar el genotipado de los virus recombinantes.

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

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

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

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

En un experimento separado, se amplificó el ARN viral de gripe B/Yamanashi/166/98 y se clonó en pAD3000 tal como se describe anteriormente respecto de la cepa VDM-B, con la excepción de que la amplificación se llevó a cabo durante 25 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 3 minutos. Se usaron cebadores idénticos para la amplificación de los segmentos de la cepa B/Yamanashi/166/98, con la sustitución de los siguientes cebadores para la amplificación de los segmentos de NP y NA: VDM-B 5'*Bsm*BI-NP: TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGTG (SEC ID N°: 75) y VDM-B 3'*Bsm*BI-NP: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACAGCATTTTTTAC (SEC ID N°: 76) y Bm-NAb-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCA (SEC ID N°: 77) y Bm-NAb-1557R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCA TTTT (SEC ID N°: 78), respectivamente. Los plásmidos de B/Yamanashi/166/98 se denominaron pAB251-PB1, pAB252-PB2, pAB253-PA, pAB254-HA, pAB255-NP, pAB256-NA, pAB257-M, y pAB258-NS. Se identificaron tres diferencias de nucleótidos silentes en PA, facilitando el genotipado de virus recombinante y reorganizante de B/Yamanashi/166/98.

EJEMPLO 6: GENERACIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE B RECOMBINANTE Y DE VIRUS DE LA GRIPE REORGANIZADO INFECCIOSO

Para superar los obstáculos encontrados en el intento de crecer gripe B en un sistema de cultivo libre de virus auxiliar, la presente divulgación proporciona nuevos vectores y protocolos para la producción de virus de la gripe de cepa B recombinantes y reorganizantes. El sistema de vector usado para el rescate de virus de la gripe B se basa en el desarrollado para la generación del virus de la gripe A (Hoffmann et al. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113; Hoffmann y Webster (2000) Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus

from eight plasmids J Gen Virol 81:2843-7). Se cultivaron conjuntamente células 293T o COS-7 (células de primate con una alta eficacia de transfección y de actividad de polI) con células MDCK (permisivas para el virus de la gripe); las células 293T se mantuvieron en medio OptiMEM I-AB que contenía FBS al 5%, las células COS-7 se mantuvieron en medio DMEM I-AB que contenía FBS al 10%. Las células MDCK se mantuvieron en MEM 1x, FBS al 10 % con la adición de agentes antibióticos y antimicóticos. Antes de la transfección con los vectores de genoma viral, se lavaron las células con 5 ml de PBS o de medio sin FBS. Se añadieron diez ml de tripsina-EDTA a las células confluentes en un matraz de 75 cm² (las células MDCK se incubaron durante 20-45 min, las células 293T se incubaron durante 1 min). Las células se centrifugaron, y se resuspendieron en 10 ml de OptiMEM I-AB. Después se diluyó un ml de cada línea celular suspendida en 18 ml de OptiMEM I-AB, y se mezcló. Después se separaron las células en alícuotas en una placa de 6 pocillos a 3 ml/pocillo. Después de 6-24 horas, se mezcló 1 µg de cada plásmido en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con OptiMEM I-AB para los plásmidos (x µl de plásmidos + x µl de OptiMEM I-AB + x µl de TransIT-LT1 = 200 µl); 2 µl de TransIT-LT1 por µg de ADN de plásmido. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Después se añadieron 800 µl de OptiMEM I-AB. Se retiró el medio de las células, y se añadió la mezcla de transfección a las células (t = 0) a 33 °C durante 6-15 horas. La mezcla de transfección se retiró lentamente de las células, y se añadió 1 ml de OptiMEM I-AB, y las células se incubaron a 33 °C durante 24 horas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se añadió 1 ml de OptiMEM I-AB que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina a las células. A las 96 horas después de la transfección, se añadió 1 ml de OptiMEM I-AB que contenía 1 µg/ml de TPCK-tripsina a las células.

Entre 4 días y 7 días después de la transfección se extrajo 1 ml del sobrenadante de cultivo celular y se controló mediante ensayo de HA o de placa. En resumen, se separó en alícuotas 1 ml de sobrenadante en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se transfirieron novecientos µl de sobrenadante a un tubo nuevo, y se efectuaron diluciones en serie a 500 µl/pocillo a células MDCK (por ejemplo, en placas de 12 pocillos). El sobrenadante se incubó con las células durante 1 hora y después se retiró y se reemplazó con medio de infección (MEM 1x) que contenía 1µg/ml de TPCK-tripsina. Entonces se efectuaron los ensayos de HA o los ensayos de placa. Por ejemplo, ara los ensayos de placa, se titularon los sobrenadantes en células MDCK que se incubaron con un recubrimiento de agarosa al 0,8% durante tres días a 33 °C. Para la infección de huevos, se recogió el sobrenadante de células transfectadas a los seis o siete días después de la transfección, se inyectaron 100 µl de las diluciones de virus en Opti-MEM I a huevos de gallina embrionados de 11 días de edad a 33 °C. Se determinó el título tres días después de la inoculación mediante ensayo de TCID₅₀ en células MDCK.

Para generar VDM-B, se transfectaron células 293T-MDCK o COS-7-MDCK cultivadas conjuntamente con 1 µg de cada plásmido. Cuando se examinaron a los 5 a 7 días después de la transfección, las células MDCK cultivadas conjuntamente mostraron efectos citopáticos (CPE), indicando la generación de virus VDM-B infeccioso a partir del ADNc clonado. No se observaron CPE en las células transfectadas con siete plásmidos (Tabla 14). Para determinar la eficacia del sistema de transfección de ADN para la generación de virus, se titularon los sobrenadantes de células siete días después de la transfección en células MDCK y se determinó el título de virus mediante ensayo de placa. El título de virus del sobrenadante de células 293T-MDCK cultivadas conjuntamente fue de 5,0 x 10⁶ ufp/ml u de 7,6 x 10⁶ ufp/ml en células COS7-MDCK.

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

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

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

Se obtuvieron resultados comparables en los experimentos de transfección que utilizaban los vectores plasmídicos de B/Yamanashi/166/98. Estos resultados demuestran que el sistema de transfección permite la generación reproducible desde cero del virus de la gripe B a partir de ocho plásmidos.

Genotipado de gripe B recombinante

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

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

Fenotipado de rVDM-B

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

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

Se llevó a cabo el ensayo de fenotipo ca-ts mediante titulación de TCID₅₀ de muestras de virus a 25, 33, y 37°C. Este formato de ensayo mide el título de TCID₅₀ examinando el efecto citopático (CPE) del virus de la gripe en monocapas de células primarias de riñón de pollo en placas de cultivo de 96 pocillos a diferentes temperaturas (25 °C, 33 °C, 37 °C). Este ensayo no depende de la morfología de la placa, que varía con la temperatura y las cepas virales; en su lugar, depende únicamente de la capacidad del virus de la gripe para replicarse y causar CPE. Una suspensión de células primarias de riñón de pollo (PCK), preparada mediante tripsinización del tejido primario, se suspendió en medio MEM (de Earl) que contenía FCS al 5%. Las células PCK se suspendieron en placas de cultivo de 96 pocillos durante 48 horas para preparar una monocapa con >90% de confluencia. Tras 48 horas, la monocapa de células PCK se lavó durante una hora con medio MEM sin suero que contenía L-glutamina 5 mM, antibióticos, aminoácidos no esenciales, citado como medio de ensayo de fenotipo (PAM). Se prepararon diluciones en serie de diez veces del virus en bloques de 96 pocillos que contenían PAM. Entonces se emplacaron las muestras de virus diluido en la monocapa de PCK lavada en las placas de 96 pocillos. A cada dilución de la muestra de virus, se usaron replicados de seis pocillos para la infección con el virus diluido. Se incluyeron células no infectadas como control celular en forma de replicado de 6 pocillos para cada muestra. Cada muestra de virus se tituló en 2-4 replicados. Se incluyó virus de control de fenotipo con títulos predeterminados a 25 °C, 33 °C y 37 °C en cada ensayo. Para determinar el fenotipo ts de las muestras de virus, se incubaron las placas durante 6 días a 33 °C y 37 °C en incubadores de cultivo celular de CO₂ al 5%. Para la caracterización del fenotipo ca se incubaron las placas a 25 °C durante 10 días. El título de virus se calculó mediante el método de Karber y se comunicó como media de Log₁₀ (n=4) de TCID₅₀ título/ml ± desviación típica. Las desviaciones típicas de los títulos de virus presentados en las Fig. 1-3 se encontraban en el intervalo de 0,1 a 0,3. La diferencia en título de virus a 33 °C y 37°C se usaron para determinar el fenotipo ts y la diferencia en título de virus a 25 °C y 33 °C se usaron para determinar el fenotipo ca.

El virus VDM-B recombinante procedente de plásmido (VDM-B rec) expresó los dos fenotipos característicos en cultivo celular, ca y ts, tal como se esperaba. El fenotipo ca, replicación eficaz a 25 °C, se mide funcionalmente como una diferencia en título entre 25 °C y 33 °C menor o igual a 2 log₁₀ cuando se ensaya en células PCK. Tanto el VDM-B progenitor como recVDM-B expresaron ca; la diferencia entre 25 °C y 33 °C fue de 0,3 y 0,4 log₁₀, respectivamente (Tabla 15). El fenotipo ts también se mide observando los títulos a dos temperaturas diferentes en células PCK; para este fenotipo, sin embargo, el título a 37 °C debe ser menor que el título a 33 °C en 2 log₁₀ o más. La diferencia entre 33 °C y 37 °C para el VDM-B progenitor y recVDM-B fue de 3,4 y 3,7 log₁₀, respectivamente (Tabla 15). Por lo tanto, el virus VDM-B procedente de plásmido recombinante expresó los fenotipos tanto ca como ts.

El virus recombinante tenía un título de 7,0 log₁₀ TCID₅₀/ml a 33 °C y de 3,3 TCID₅₀/ml a 37 °C y de 8,8 log₁₀ TCID₅₀/ml a 25 °C (Tabla 15). Por lo tanto, el virus recombinante procedente de la transfección con los ocho plásmidos de segmento genómico de VDM-B de la gripe tiene los fenotipos tanto ca como ts.

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

	Temperatura (°C)			
	25	33	37	
	Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml (Media ± DT)			
ca B/Ann Arbor/01/66 (VDM-B)	8,8 ± 0,3	8,5 ± 0,05	5,1 ± 0,1	ca, ts
RecVDM-B	7,4 ± 0,3	7,0 ± 0,13	3,3 ± 0,12	ca, ts
Rec53-VDM-B	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,0	5,3 ± 0,1	ca, no-ts

Las células primarias de riñón de pollo se infectaron con el virus VDM-B progenitor y el virus recombinante procedente de plásmidos (recVDM-B). El título de virus se determinó a tres temperaturas diferentes.

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

- 5 Los segmentos HA y NA de varias cepas diferentes que representan los linajes principales de la gripe B se amplificaron y clonaron en pAD3000, esencialmente tal como se describe anteriormente. Los cebadores se optimizaron para amplificación simultánea por RT-PCR de los segmentos HA y NA. La comparación de las regiones terminales del ARNV que representa la región no codificante del segmento 4 (HA) y del segmento 6 (NH/NA) reveló que los 20 nucleótidos terminales en el extremo 5' y 15 nucleótidos en el extremo 3' eran idénticos entre los genes HA y NA de los virus de la gripe B. Se sintetizó un par de cebadores para RT-PCR (las secuencias subrayadas son específicas de virus de la gripe B) Bm-NAb-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG CA (SEC ID N°: 87); Bm-NAb-1557R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGT AAC AAG AGC ATT TT (SEC ID N°: 88) y se usaron para amplificar simultáneamente los genes HA y NA a partir de varias cepas de gripe B (Fig. 8). Se aislaron los fragmentos de PCR de HA y NA de B/Victoria/504/2000, B/Hawaii/10/2001, y B/Hong Kong/330/2001, se digirieron con *Bsm*BI y se insertaron en pAD3000. Estos resultados demostraron la aplicabilidad de estos cebadores para la generación eficaz de plásmidos que contenían los genes HA y NA de gripe B de varios virus de tipo silvestre diferentes que representan los linajes principales de gripe B. Los productos de RT-PCR pueden usarse para secuenciación y/o clonación en los plásmidos de expresión.
- 20 Para demostrar la utilidad de B/Yamanashi/166/98 (un virus similar a B/Yamagata/16/88) para expresar de manera eficaz antígenos de diversos linajes de gripe B, se generaron reorganizantes que contenían PB1, PB2, PA, NP, M, NS de B/Yamanashi/166/98 y la HA y NA de cepas que representaban los linajes tanto Victoria como Yamagata (reorganizantes 6+2). Se transfectaron de manera transitoria células COS7-MDCK cultivadas conjuntamente con seis plásmidos que representaban B/Yamanashi/166/98 y dos plásmidos que contenían el ADNc de los segmentos HA y NA de dos cepas del linaje B/Victoria/2/87, B/Hong Kong/330/2001 y B/Hawaii/10/2001, y una cepa del linaje B/Yamagata/16/88, B/Victoria/504/2000, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. De seis a siete días después de la transfección se titularon los sobrenadantes en células MDCK nuevas. Los tres virus reorganizantes 6+2 tenían títulos entre 4-9 x 10⁶ ufp/ml (Tabla 16). Estos datos demostraron que los seis genes internos de B/Yamanashi/166/98 podían formar de manera eficiente virus infecciosos con segmentos génicos de HA y NA de ambos linajes de gripe B.

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

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

1	---	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1
2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2
3	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA
4	pAB254-HA	pAB254-HA	pAB281-HA	pAB285-HA	pAB287-HA
5	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP
6	pAB256-NA	pAB256-NA	pAB291-NA	pAB295-NA	pAB297-NA
7	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M
8	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA
Virus recombinante	8	6	2	6	2
ufp/ml ^a	0	4 x 10 ⁶	9 x 10 ⁶	6 x 10 ⁶	7 x 10 ⁶

Se obtienen títulos relativamente elevados mediante replicación de B/Yamanashi/166/98 de tipo silvestre en huevos. Se llevaron a cabo experimentos para determinar si esta propiedad era un fenotipo inherente de los seis genes "internos" de este virus. Para evaluar esta propiedad, se comparó el rendimiento de B/Victoria/504/2000 de tipo silvestre, que se replica solo de manera moderada en huevos, con el rendimiento del reorganizante 6+2 que expresaba HA y NA de B/Victoria/504/2000. Se inocularon estos virus además de los de tipo silvestre y B/Yamanashi/166/98 recombinantes en 3 o 4 huevos de gallina embrionados, bien a 100 o 1000 ufp. Tres días después de la infección, se recogieron los fluidos alantoicos de los huevos y se determinaron los títulos de TCID₅₀ en

células MDCK. Los reorganizantes 6+2 produjeron cantidades similares de virus en el fluido alantoico de la cepa B/Yamanashi/166/98 wt y recombinante (Fig. 9). La diferencia en título entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6+2 fue de aproximadamente $1,6 \log_{10}$ TCID₅₀ ($0,7-2,5 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, IC del 95%). La diferencia entre B/Victoria/504/2000 y el recombinante 6+2 se confirmó en tres experimentos separados ($P < 0,001$). Estos resultados demostraron que las propiedades de crecimiento en huevo de B/Yamanashi/166/98 pueden conferirse a antígenos de HA y NA que se expresan normalmente a partir de cepas que se replican mal en huevos.

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

El virus VDM-B (B/Ann Arbor/1/66 ca) está atenuado en seres humanos, muestra un fenotipo atenuado en hurones y muestra un fenotipo adaptado al frío y sensible a la temperatura en cultivo celular. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes internos de VDM-B se compararon con las secuencias en la base de datos de gripe de Los Álamos (en la world wide web en: flu.lanl.gov) usando el algoritmo de búsqueda BLAST. Se identificaron ocho aminoácidos únicos para VDM-B y no presentes en cualquier otra cepa (Tabla 17). Los segmentos genómicos que codifican PB1, BM2, NS1 y NS2 no muestran restos sustituidos de manera única. Las proteínas PA y M1 pueden tener cada una dos, y la proteína NP tiene cuatro aminoácidos únicos sustituidos (Tabla 17). Un resto de aminoácido sustituido se encuentra en PB2 en la posición 630 (una cepa adicional, B/Harbin/7/94 (AD170572) también tiene un resto de arginina en la posición 630).

Estos resultados sugirieron que los segmentos génicos PB2, PA, NP y M1 pueden estar implicados en el fenotipo atenuado de VDM-B. De un modo análogo a lo descrito anteriormente para VDM-A, el sistema de ocho plásmidos puede utilizarse para generar virus recombinante y reorganizante (sencillo y/o doble, es decir, reorganizantes 7:1; 6:2) de manera independiente de virus auxiliar simplemente mediante la transfección conjunta de los plásmidos relevantes en células cultivadas, tal como se describen anteriormente con respecto a VDM-A. Por ejemplo, pueden usarse los 6 genes internos de B/Lee/40 en conjunción con segmentos de HA y NA procedentes de VDM-B para generar reorganizantes 6+2.

Tabla 17. Aminoácidos sustituidos de manera única de B/Ann Arbor/1/66

Nº	ca B/Ann Arbor/1/66			Secuencias alineadas (virus de tipo silvestre)		Número de secuencias alineadas
	pos.	aminoácido	codón	aminoácido	codón	
PB1	0		-		-	23
PB2	1	630	Arg630	AGA	Ser630	AGC
PA	2	431	Met431	ATG	Val431	GTG
		497	His497	CAT	Tyr497	TAT
NP	4	55	Ala55	GCC	Thr55	ACC
		114	Ala114	GCG	Val114	GTG
		410	His410	CAT	Pro410	CCT, CCC
		509	Thr509	GAC	Ala509	GGC
M1	2	159	Gln159	CAA	His159	CAT
		183	Val183	GTG	M183	ATG
BM2	0		-		-	24
NS1	0		-		-	80
NS2	0		-		-	80

La secuencia de aminoácidos deducida de ocho proteínas de ca B/Ann Arbor se usó en una búsqueda BLAST. Se muestran las posiciones de aminoácidos que fueron diferentes entre VDM-B y las secuencias alineadas. Los nucleótidos en los codones que están subrayados representan las posiciones sustituidas.

Para determinar si las 8 únicas diferencias de aminoácidos tuvieron cualquier impacto en los fenotipos característicos de VDM-B, se construyó un virus recombinante en el que todas las ocho posiciones de nucleótidos codificaron los aminoácidos que reflejaban el complemento genético de gripe de wt. Se construyó un conjunto de plásmidos en el que los ocho restos de los genes PA, NP, y M1 estaban cambiados mediante mutagénesis de sitio dirigido para reflejar los aminoácidos de tipo silvestre (tal como se indica en la Tabla 17). Se generó un recombinante con los ocho cambios, denominado rec53-VDM-B, mediante cotransfección de los plásmidos contruidos en células COS7-MDCK cultivadas conjuntamente. El cultivo conjunto de células MDCK y el crecimiento a 33 °C aseguró que el sobrenadante contuviese títulos virales elevados de seis a siete días después de la transfección. Los sobrenadantes de las células transfectadas se titularon y se determinó el título en células MDCK mediante un ensayo de placa y células PCK a 33 °C y 37 °C.

Tal como se muestra en la Fig. 13, en dos experimentos diferentes independientes, recVDM-B expresó el fenotipo ts en células tanto MDCK como PCK. El virus triple reorganizante rec53-VDM-B diseñado que portaba los ocho cambios de aminoácidos expresaron el fenotipo no-ts, la diferencia en el título entre 33 °C y 37 °C fue de solo $0,7 \log_{10}$ en células PCK. Este título fue menor de la diferencia de $2 \log_{10}$ característica de la definición de ts y significativamente menor que la diferencia de $\sim 3 \log_{10}$ observada con recVDM-B. Estos resultados demuestran que

la alteración de los ocho aminoácidos en las proteínas PA, NP, y M1 fue suficiente para generar un virus no-ts similar a tipo silvestre con glucoproteínas tanto homólogas como heterólogas.

Entonces se determinó la contribución de cada segmento génico al fenotipo ts. Se generaron recombinantes procedentes de plásmidos que portaban segmentos génicos bien de PA, NP, o M con el complemento de aminoácidos de tipo silvestre mediante la técnica de cotransfección de ADN. Todos los recombinantes de un solo gen mostraron restricción de crecimiento a 37 °C en células MDCK y en células PCK (Fig. 14), indicando que los cambios en ninguno de los segmentos génicos eran capaces de revertir el fenotipo ts. Además, los virus recombinantes que portaban los segmentos génicos NP y M o PA y M juntos también mantuvieron el fenotipo ts. Por el contrario, los virus recombinantes que portaron los segmentos génicos tanto PA como NP tenían una diferencia en el título entre 37 °C y 33 °C de 2,0 log₁₀ o menor, similar a rec53-VDM-B. Estos resultados muestran que los genes NP y PA tienen una contribución principal al fenotipo ts.

Para determinar si todos los cuatro aminoácidos en la proteína NP y dos en la proteína PA contribuyen a no-ts, se generaron recombinantes de triple gen y doble gen con genes NP y PA alterados (Fig. 15). La sustitución de dos aminoácidos en la proteína NP, A114 → V114 y H410 → P410 dieron como resultado un fenotipo no-ts. Los virus con la sustitución H410 → P410 individual en la nucleoproteína mostraron un fenotipo no-ts en MDCK y PCK. Por otra parte, la sustitución A55 → T55 individual mostró un fenotipo ts, al igual que lo hizo la sustitución individual en la posición 509. Estos resultados indican que los restos de aminoácido V114 y P410 en NP están implicados en el crecimiento eficaz a 37 °C (Fig. 21A). Se empleó una estrategia similar para diseccionar la contribución de los dos aminoácidos en el gen de PA. Se construyó un conjunto de recombinantes, portando cada uno un segmento génico de NP con cuatro aminoácidos consenso de tipo silvestre y un gen PA con solo uno de los dos aminoácidos consenso de tipo silvestre. La sustitución H497 → Y497 siguió siendo ts (Fig. 21B), demostrando que este locus tiene poco impacto en la expresión del fenotipo. Por el contrario, la sustitución de M431 con V431 dio como resultado una reversión del fenotipo ts. Estos resultados demuestran que los aminoácidos A114 y H410 en NP y M431 en PA son los determinantes principales para la sensibilidad a la temperatura de VDM-B.

Basándose en las pruebas anteriores, un fenotipo ts y un fenotipo atenuado están elevadamente correlacionados. Está bien establecido que el virus ca B/Ann Arbor/1/66 no es detectable en el tejido pulmonar de hurones infectados, mientras que los virus de la gripe B no atenuados son detectables en los pulmones después de la infección intranasal. Para determinar si una mutación idéntica subyace a los fenotipos ts y att, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

Se pasaron virus recombinantes obtenidos después de la transfección en huevos de gallina embrionados para producir una reserva de virus. Se inoculó a hurones de nueve semanas de edad por vía intranasal con 0,5 ml por orificio nasal de virus con títulos de 5,5, 6,0 o 7,0 log₁₀ ufp/ml. Tres días después de la infección se sacrificó a los hurones y se examinaron sus pulmones y cornetes nasales, tal como se ha descrito anteriormente.

Se infectó a hurones (cuatro animales en cada grupo) por vía intranasal con recVDM-B o rec53-VDM-B. Tres días después de la infección con el virus se extrajeron cornetes nasales y tejido pulmonar y se ensayó la existencia de virus. No se detectó virus en los tejidos pulmonares de hurones infectados con 7,0 log₁₀ ufp de recVDM-B. De los cuatro animales infectados con virus rec53-VDM-B con 7,0 log₁₀ ufp, se detectó virus en el tejido pulmonar de tres animales (en un animal de este grupo por razones desconocidas). En dos de los cuatro tejidos pulmonares de hurones infectados con rec53-VDM-B a una dosis menor (5,5 log ufp/ml) pudo aislarse virus del tejido pulmonar. Por lo tanto, el cambio de los ocho aminoácidos únicos en la proteína PA, NP, y M1 en restos de tipo silvestre fue suficiente para convertir un fenotipo att en un fenotipo no att.

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

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

Los resultados de los presentes inventores usando la estructura de VDM-B indicaron que los seis aminoácidos fueron suficientes para convertir un fenotipo ts/att en un fenotipo no-ts/no-att. Por lo tanto, los presentes inventores se interesaron en determinar si la introducción de estos seis restos de "atenuación" podrían transferir estas propiedades biológicas a un virus de la gripe B heterólogo, no atenuado, tal como B/Yamanashi/166/98.

Se produjeron virus B/Yamanashi/166/98 recombinante de tipo silvestre (recYam) (7) y un virus recombinante (rec6-Yam): con seis cambios de aminoácidos PA (V431→M431, H497→Y497), NP (V114→A114, P410→H410), y M1

(H159→Q159, M183→V183). RecYam mostró una reducción en el título de 0,17 log₁₀ a 37 °C en comparación con 33 °C, mientras que rec6Yam fue claramente ts, la diferencia en el título viral entre 37 °C y 33 °C fue de 4,6 log₁₀. Se recuperó virus de manera eficaz de hurones infectados con recYam, tal como se esperaba para un virus de la gripe B de tipo silvestre típico. Cuando se inocula rec6Yam en hurones, no se detectó virus en los tejidos pulmonares (Tabla 18). Por lo tanto, la transferencia de los locus de ts/att de VDM-B es suficiente para transferir los fenotipos ts y att a un virus divergente.

Tabla 18. Estudios de atenuación en hurones

Virus recombinante	componentes de wt ^a	Fenotipo ts	Hurones	Dosis [log10 ufp]	Cornetes nasales ^b [log10ufp/g]	Tejido pulmonar [log10 EID50/g] ^c
rVDM-B	ninguno	ts	4	6,0	4,01	<1,5
rec53-B	NP, PA, M	no-ts	4	6,0	4,65	3,81
rec62-B	NP, PA	no-ts	4	6,0	4,69	<1,5
rec71NP-B	NP	ts	4	6,0	4,13	<1,5
rec71M-B	M	ts	4	6,0	4,17	<1,5
RecYam		no-ts	4	6,0	4,92	3,31
rec6Yam		ts	4	6,0	4,02	<1,5

^aSe usaron virus recombinantes con estructura de VDM-B que diferían en los aminoácidos de tipo silvestre (para detalles, véase la Tabla 2) para hurones infectados por vía intranasal. RecYam es B/Yamanashi/166/98 recombinante y Rec6Yam representa un virus que tiene seis "cambios de aminoácidos de atenuación de VDM-B" en NP, PA, y M1 con una estructura de B/Yamanashi.

^bTres días después de la infección, se determinó el título de virus de los cornetes nasales y tejido pulmonar, se muestra el título medio de cuatro hurones infectados.

^c<1,5 indica que no se detectó virus.

Tal como se describe anteriormente con respecto a las cepas de gripe A, la sustitución de los restos indicados anteriormente, por ejemplo, PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵⁰⁹ (A509T); M1¹⁵⁹ (H159Q) y M1¹⁸³ (M183V), confiere los fenotipos ts y att. Por consiguiente, las variantes de cepa de gripe B diseñadas por ingeniería genética de manera artificial que tenían uno o más de estas sustituciones de aminoácidos muestran los fenotipos ts y att y son adecuadas para su uso, por ejemplo, como virus de cepa donante maestra, en la producción de vacunas de virus de la gripe vivas atenuadas.

EJEMPLO 9: RESCATE DE VIRUS DE GRIPE A PARTIR DE OCHO PLÁSMIDOS MEDIANTE ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS VERO

Se ha sugerido previamente que puede recuperarse virus de la gripe A recombinante de células Vero (Fodor et al. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA J. Virol. 73:9679-82; Hoffmann et al. (2002) Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccine 20:3165-3170). El método comunicado requiere del uso de reactivos lipídicos y solo se ha documentado para una sola cepa de una cepa de virus de la gripe A de laboratorio elevadamente competente para replicación (A/WSN/33 y A/PR/8/34), haciendo que sea de aplicación limitada en la producción de virus vivo atenuado adecuado para la producción de vacunas. En el presente documento se describe un nuevo método para recuperar virus de la gripe recombinante de células Vero usando electroporación. Estos métodos son adecuados para la producción de virus de cepas tanto de gripe A como de gripe B, y permiten la recuperación de, por ejemplo, virus adaptados al frío, sensibles a la temperatura y atenuados a partir de células Vero crecidas en condiciones sin suero, facilitando la preparación de vacuna viva atenuada adecuada para su administración en, por ejemplo, formulaciones de vacuna intranasal. Además de su amplia aplicabilidad entre cepas de virus, la electroporación no requiere de reactivos adicionales distintos de medio de crecimiento para el sustrato celular y por lo tanto tiene un potencial menor para contaminantes no deseados. En particular, este método es eficaz para generar virus recombinantes y reorganizantes usando células Vero adaptadas a crecimiento en condiciones sin suero, tales como aislados de células Vero certificados como libres de patógenos para la producción de vacunas. Esta característica apoya la elección de la electroporación como método adecuado para la introducción comercial de ADN en sustratos celulares.

Se comparó la electroporación con una diversidad de métodos para la introducción de ADN en células Vero, incluyendo transfección usando numerosos reactivos basados en lípidos, precipitación por fosfato de calcio y microinyección celular. Aunque se ha obtenido cierto éxito usando reactivos basados en virus para el rescate de gripe A, solo la electroporación demostró rescatar gripe B así como gripe A de células Vero.

Un día antes de la electroporación, se separaron las células Vero confluentes al 90 - 100%, y se sembraron a una densidad de 9 x 10⁶ células por matraz T225 en MEM suplementado con pen/estrep, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y FBS al 10% (MEM, FBS al 10%). Al día siguiente, se tripsinizaron las células y se resuspendieron en 50 ml de suero salino tamponado con fosfato (PBS) por matraz T225. Entonces se precipitan las células y se resuspenden en 0,5 ml de OptiMEM I por matraz T225. Opcionalmente, puede usarse medio OptiMEM a medida que no contiene componentes de procedencia humana o animal. Después de la determinación de la densidad celular,

por ejemplo, contando una disolución 1:40 en un hemocitómetro, se añadieron 5×10^6 células a una cubeta de electroporación de 0,4 cm en un volumen final de 400 µl de OptiMEM I. Se añadieron entonces veinte µg de ADN que consistía en una mezcla equimolar de ocho plásmidos que incorporaban el genoma de VDM-A o VDM-B en un volumen de no más de 25 µl a las células en la cubeta. Las células se mezclaron mediante golpecitos suaves y se electroporaron a 300 voltios, 950 microfaradios en un Gene Pulser II de BioRad equipado con un dispositivo Capacitance Extender Plus (BioRad, Hercules, CA). La constante de tiempo debe encontrarse en el intervalo de 28 - 33 milisegundos.

Los contenidos de la cubeta se mezclaron mediante golpecitos suaves y después de 1-2 min de la electroporación, se añadieron 0,7ml de MEM, FBS al 10% con una pipeta de 1 ml. Se mezclaron de nuevo las células pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo unas cuantas veces y se separaron entre dos pocillos de una placa de 6 pocillos que contenía 2 ml de MEM por pocillo, FBS al 10%. Después se lavó la cubeta con 1 ml de MEM, FBS al 10% y se separó entre los dos pocillos hasta un volumen final de aproximadamente 3,5 ml por pocillo.

En experimentos alternativos, se electroporaron células Vero adaptadas a condiciones de crecimiento sin suero, por ejemplo, en OptiPro (SFM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) tal como se describe anteriormente, salvo que después de la electroporación en OptiMEM I, las células se diluyeron en OptiPro (SFM) en el que se cultivaron posteriormente para el rescate del virus.

Las células electroporadas se crecieron entonces en condiciones adecuadas para la replicación y recuperación del virus introducido, es decir, a 33 °C para las cepas donantes maestras adaptadas al frío. Al día siguiente (por ejemplo, aproximadamente 19 horas después de la electroporación), se retiró el medio y las células se lavaron con 3 ml por pocillo de OptiMEM I u OptiPro (SFM). Se añadió a cada pocillo un ml de OptiMEM I u OptiPro (SFM) por pocillo que contenía pen/estrep, y se recogieron a diario los sobrenadantes reemplazando el medio. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C en SPG. Se observó un pico de producción de virus típicamente entre 2 y 3 días después de la electroporación.

Tabla 19: Resultados del rescate de 8 plásmidos de cepas VDM en diferentes tipos celulares y mediante diferentes métodos de transfección

Sustrato	Método	Nº de ensayo	Resultado (virus infeccioso recuperado)
VDM-B			
COS-7/MDCK	Lipo	3	positivo
COS-7/MDCK	CaPO4	2	positivo
MRC-5	Lipo	5	negativo
MRC-5	CaPO4	3	negativo
MRC-5	Electroporación	2	negativo
WI-38	Lipo	2	negativo
WI-38	Electroporación	4	negativo
WI-38	Microinyección	1	negativo
LF1043	Lipo	1	negativo
LF1043	CaPO4	2	negativo
Vero	Lipo	7	negativo
Vero	CaPO4	2	negativo
Vero/MDCK	Lipo	1	negativo
Vero (suero)	Electroporación	5	positivo (5/5)
Vero (sin suero)	Electroporación	4	positivo (4/4)
VDM-A			
Vero (suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)
Vero (sin suero)	Electroporación	3	positivo (3/3)

EJEMPLO 10: SISTEMA DE VECTOR DE VIRUS DE LA GRIPE PARA ADMINISTRACIÓN GÉNICA

Los vectores descritos en el presente documento también pueden usarse como sistemas de administración génica y para terapia génica. Para dichas aplicaciones, es deseable generar virus de la gripe recombinante, por ejemplo, virus de la gripe A o B recombinante que expresa una proteína exógena. Por ejemplo, debido a que el segmento 7 del virus de la gripe B no se corta y empalma, proporciona un elemento genético conveniente para la inserción de secuencias de ácido nucleico heterólogas. El ARNm contiene dos cistrones con dos fases abiertas de lectura que codifican las proteínas M1 y BM2. La fase abierta de lectura de BM2 o M1 se sustituye por la secuencia heteróloga de interés, por ejemplo, un gen que codifica la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP). Mediante el uso del sistema de vector basado en plásmido descrito en el presente documento, se clona el ADNc que codifica la fase abierta de lectura de M1-EGFP y BM2 en dos plásmidos diferentes. La fase abierta de lectura está flanqueada por la región no codificante del segmento 7, que contiene las señales necesarias para la replicación y transcripción. Como alternativa, se construyen dos plásmidos: uno que contiene la ORF de M1 y el otro que contiene EGFP-BM2. La cotransfección de los nueve plásmidos resultantes da como resultado la generación de un virus de la gripe B

recombinante que contiene la secuencia génica heteróloga. De manera similar, puede expresarse EGFP a partir del segmento NS1 de la gripe A.

El virus de la gripe B "verde" ejemplar puede usarse para la estandarización en ensayos de virus, tales como ensayos de micro neutralización. La combinación de la tecnología basada en plásmidos y la detección sencilla de expresión de proteínas (la fluorescencia procedente de EGFP puede controlarse mediante microscopía, tal como se ilustra en la Figura 2), permite la optimización de la expresión de proteínas.

EJEMPLO 11: ESTUDIOS GENÉTICOS DE CEPAS DE VACUNA DE LA GRIPE H3N2 RECIENTES

La cepa viva atenuada adaptada al frío de la gripe, A/AA/6/60, en ejemplos típicos preferidos, es el virus donante maestro (VDM-A) para las vacunas de la gripe A FluMist™. Los 6 genes internos de VDM-A confieren los fenotipos de adaptación al frío (*ca*), sensibilidad a la temperatura (*ts*) y atenuación (*att*) para cada una de las cepas de vacuna. Usando genética inversa, se demuestra que múltiples aminoácidos segregados entre tres segmentos génicos: PB1-K391E, E581G, A661T, PB2-N265S, y NP-D34G que controlan la expresión de los fenotipos *ts* y *att* de VDM-A. El rescate de plásmido de cepas de vacuna 6:2 permite una generación más eficaz de vacunas de la gripe que las técnicas reorganizantes clásicas.

Las vacunas de la gripe inactivadas para la temporada 2003-04 contenían el antígeno de A/Panama/99 (H3N2) y fueron incapaces de provocar respuestas de anticuerpo robustas en niños seronegativos para las cepas H3N2 derivadas similares a A/Fujian/411/02 que circularon durante esa temporada. Véanse las Figuras 22 y 23. Desafortunadamente, A/Fujian/411/02 no se replicó bien en huevos embrionados y, por lo tanto, prohibió su uso para la fabricación de vacunas. Usando la tecnología de genética inversa, los presentes inventores demostraron que la pérdida en el equilibrio en las actividades de HA y NA fue responsable de la pobre replicación de la cepa prototipo A/Fujian/411/02 en huevos. Véanse las Figuras 29 a 34. El virus A/Fujian pudo obtener su eficiente replicación en huevos bien aumentando su actividad de HA o reduciendo su actividad de NA. Específicamente, los presentes inventores demostraron que mientras que varias sustituciones de aminoácidos individuales fueron capaces de potenciar ligeramente la replicación de la cepa A/Fujian/411/02 en huevos, varias combinaciones proporcionaron una potenciación mucho más robusta. Véanse las Figuras 35 a 38. El presente estudio ha demostrado que es factible mejorar el crecimiento del virus de la gripe en huevos de gallina embrionados y/o células hospedadoras introduciendo cambios específicos en los genes de HA y NA sin afectar a la antigenicidad del virus.

Para producir una cepa viable en huevos, se evaluó un conjunto de reorganizantes 6:2 de H3N2 del linaje A/Fujian/411/02 respecto de su replicación en células MDCK, huevos embrionados y hurones. Aunque A/Fujian/411/02 no creció en huevos, una adaptación a huevo de este virus dio como resultado dos sustituciones de aminoácidos en HA, H183L y V226A que permitió el crecimiento de virus en huevos embrionados. Además, se compararon en su secuencia una cepa adaptada a huevo A/Wyoming/03/2003 que crecía bien en huevos y hurones y la vacuna de A/Sendai/H-F4962/02 que crecía bien en huevos, pero que no se replicó bien en hurones. Se determinó que G186V y V226I en HA, y/o Q119E y K136Q en NA eran necesarios para una replicación eficaz de virus *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, estos cambios de aminoácidos no tuvieron efecto en la antigenicidad del virus. Se contempla y espera la adopción de dichas técnicas para producir cepas capaces del crecimiento en huevos (para cepas que son difíciles/problemáticas para su crecimiento en huevos) o para producir cepas más capaces de crecimiento en huevos (para cepas que ya pueden crecer en huevos) para otros virus de la gripe.

Se estudió la base molecular para la deriva antigénica de cepas A/Panama/99 a cepas similares a A/Fujian/02 cambiando grupos de restos de HA de A/Panama/99 a aquellos de A/Wyoming/03. Véase la Figura 24. Se examinó la antigenicidad de los reorganizantes 6:2 modificados mediante ensayos de HAI y de microneutralización usando sueros de hurón de animales inmunizados con A/Panama/99 o A/Wyoming/03. Véanse las Figuras 25 a 28. Se determinó que solo unos pocos cambios eran responsables de la deriva antigénica mientras que otros tuvieron un impacto más dramático en la replicación del virus. Por lo tanto, tal como indican los datos, se usa opcionalmente genética inversa para modificar cepas de vacuna para modificar los rendimientos de vacuna sin afectar a la antigenicidad del virus.

Materiales y métodos

Cepas virales, células y anticuerpos: Las cepas de tipo silvestre (wt) de la gripe A, A/Fujian/411/02 (A/Fujian), A/Sendai-H/F4962/02 (A/Sendai) y A/Wyoming/03/03 (A/Wyoming), se obtuvieron del Centro para el Control de Enfermedades (Center for Disease Control) (Atlanta, GA) y se amplificaron una vez en células MDCK o en huevos de pollo embrionados (huevos). La cepa Ankara del virus vaccinia modificado que expresaba T7 ARN polimerasa de bacteriófago (MVA-T7) se creció en células CEK. Se mantuvieron células HEp-2, COS-7 y MDCK (obtenidas a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collections), ATCC) en medio esencial mínimo (MEM) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 5%. Se produjeron en pollos antisueros policlonales contra A/Ann Arbor/6/60, A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/03. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la proteína NP de gripe A a través de BioDesign (Saco, MI).

Generación de reorganizantes 6:2 recombinantes: Se generaron reorganizantes 6:2 recombinantes que contenían los segmentos de ARN de HA y NA de las cepas H3N2 reorganizados en VDM-A de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. En resumen, se transfectó un conjunto de seis plásmidos que contenían los genes internos

de VDM-A junto con los plásmidos de expresión de HA y NA en células COS-7/MDCK cultivadas conjuntamente usando reactivos TransIT LT1 (Mirus, Madison, WI). El sobrenadante de cultivo celular transfectado se recogió a los 3 días después de la transfección y se usó para infectar células MDCK nuevas y huevos de gallina embrionados de 10 días de edad. Las células MDCK infectadas se incubaron a 33°C hasta que el 80-90% de las células mostraron efecto citopático. Los huevos de gallina embrionados se incubaron a 33°C durante tres días y se recogieron los fluidos alantoicos y se almacenaron a -80°C en presencia del estabilizante SPG (sacarosa 0,2 M, KH₂PO₄ 3,8 mM, K₂HPO₄ 7,2 mM, glutamato monosódico 5,4 mM). Se determinó el título de virus mediante ensayo de placa en células MDCK incubadas bajo un revestimiento que consistía en L15/MEM 1x, agarosa al 1% y TPCK-tripsina 1 µg/ml a 33°C durante 3 días. Las placas se enumeraron mediante inmunotinción usando anticuerpos policlonales anti-VDM-A.

Clonación de plásmidos de expresión de HA y NA: Para producir virus reorganizantes 6:2 recombinantes que contengan segmentos de HA y NA de subtipo H3N2 y los seis segmentos de ARN internos de VDM-A, y los ADNc de HA y NA de A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/03 de wt se amplificaron mediante RT-PCR usando transcriptasa inversa SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y ufp ADN polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA), el ARNv extraído como molde y los cebadores específicos de H3 y N2. Se usaron los cebadores HA-Aar15 (5'cacttatattcacctgcctcagggagcaaaagcagggg3' SEC ID N°: 90) y HA-Aar13 (5'cctaacatatcacctgcctcgtattagtagaacaagggtgtt3' SEC ID N°: 91) para amplificar el segmento de HA. Se usaron los cebadores N2-Aar15 (5'cacttatattcacctgcctcagggagcaaaagcaggagt3' SEC ID N°: 92) and N2-Aar13 (5'cctaacatatcacctgcctcgtattagtagaacaaggagttt3' SEC ID N°: 93) para amplificar el segmento de NA. Los pares de cebadores de HA y NA contenían el sitio de restricción de Aar I que se había diseñado para que fuese comparable al sitio de BsmB I presente en el plásmido de expresión de pol I/pol II de pAD3000. Se secuenciaron los clones de ADNc de HA y NA y se compararon con las secuencias consenso de HA y NA que se obtuvieron mediante secuenciación directa de los productos de ADNc de HA y NA amplificados mediante RT-PCR. Cualquier mutación introducida en los clones de ADNc durante el proceso de clonación se corrigió mediante el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA).

Ensayo HAI (ensayo de inhibición de la hemaglutinación para el virus de la gripe): Reactivos: cRBC al 0,5% (lavado tres veces con PBS, puede usarse en 2-3 días); microplaca de 96 pocillos de fondo en U; PBS (sin Ca y Mg); Puntas; Virus de la gripe; Muestras de suero y suero de control positivo de preparaciones de título alto y bajo: Se determinó el título de HA mediante un ensayo de HA (se usó el título de virus a 1:8 para HAI. Si el título de HA de un virus dado era de 1:256, se dividía entre 8. Por lo tanto, se necesitaba diluir el virus a 1:32. Se prepararon 2,5 ml de virus para cada placa de 96 pocillos); El suero se trató opcionalmente con RDE (enzima destructora de receptor) para las muestras de hurones; Se preparó la RDE según las instrucciones del fabricante; Se combinaron RDE y muestras de suero a una dilución 1:4. Por ejemplo, se añaden 100 µl de suero a 300 µl de RDE. Se agitó vorticialmente la mezcla y se incubó durante toda la noche (18-20 h) en una incubadora a 37 °C. Se calentó la mezcla a 56 °C durante 45-50 min. Se exploró el suero respecto de aglutininas no específicas; Se mezclaron 25 µl de suero tratado con RDE con 25 µl de PBS pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3 veces; Se añadieron 50 µl de cRBC al 0,5% a la mezcla y al pocillo de control solo con PBS; Se incubó a TA durante 30-45 min (+: indica la hemaglutinación no específica parcial o completa; -: indica que no hay hemaglutinación); Las aglutininas de cRBC no específicas pueden eliminarse mediante preincubación del suero con RBC empaquetada a una proporción de 20:1 a 4 °C durante 1 h, seguido de centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los controles pueden incluir típicamente lo siguiente: control celular de cRBC; Retrotitulación de virus: dilución de 2 veces de 8 unidades/50 µl diluido desde 1:2 a 1:32 para asegurar que el virus usado se encuentra a las concentraciones correctas; Control de suero positivo: se diluye en serie 2 veces suero de título conocido junto con las muestras de suero de ensayo. Un protocolo de HAI típico puede comprender: Dilución en serie de las muestras de suero dos veces; Se añaden 25 µl de PBS a cada pocillo; Se añaden 25 µl de virus al pocillo 1A (por ejemplo, 1:2), se mezcla pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3 x; Se transfieren 25 µl del pocillo A al pocillo B (por ejemplo, 1:4) y se mezcla 3x como anteriormente, se repite la dilución hasta el pocillo H (por ejemplo, 1:256); Se añaden 25 µl de virus (8 unidades/50 µl) a muestras de suero diluidas, se mezcla hacia arriba y hacia abajo 3x y se incuba a TA durante 30-40 min; Se añaden 50 µl de cRBC al 0,5%, se mezcla bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3x; Se incuba a TA durante 30-45 min; Se registra la hemaglutinación. El título de hAI se define como la dilución más alta del suero que inhibe completamente la hemaglutinación. Si no se observa inhibición, el título es <1:4. Si todos los pocillos muestran inhibición, el título es > 1:256.

Medida de la actividad de neuraminidasa de la proteína NA expresada transitoriamente: Para medir la actividad de neuraminidasa de las proteínas NA, se expresaron NA de wt y sus derivados modificados a partir de las células transfectadas por plásmidos. Para obtener un alto nivel de expresión de las proteínas NA, se transcribió el ARN de NA a partir de los promotores de T7 y CMV ya que el gen estaba insertado cadena abajo de estos promotores duales. Se infectaron células HEP-2 en placas de 10 cm con MVA-T7 a una moi de 5,0 durante 1 h seguido de transfección de 5 µg del plásmido de NA usando reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células transfectadas se incubaron a 35°C durante 48 h. Después de lavar con suero salino tamponado con fosfato (PBS), se rascaron las células a partir de las placas y se lisaron en 100 µl de NaOAc 0,125 M, pH 5,0. La actividad de neuraminidasa en las células transfectadas se determinó mediante un ensayo fluorimétrico. Después de un ciclo de congelación-descongelación, se diluyeron en serie 50 µl de lisados celulares 2 veces y se incubaron con 150 µl de 1,2 mM de sustrato de ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneurámico (MU-NANA) (Sigma, San Luis, MO) a 37°C durante 1 h y se detuvo con 75 µl de glicina 1,0 M (pH 5,5). El nivel de fluorescencia del cromóforo 4-

metilumbeliferona liberado se determinó a 362 nm en un lector de placa SpectroMAX. El nivel de cada proteína NA expresado en las células transfectadas se controló mediante transferencia de Western usando anticuerpos de pollo anti-A/Wyoming. También se midieron las actividades de neuraminidasa de los virus A/Sendai y A/Wyoming de wt que contenían 6,0 log₁₀ UFP en 100 µl mediante el ensayo flurimétrico.

Unión a receptor y replicación de recombinantes 6:2 en células MDCK: Se determinaron la unión a receptor de HA y la cinética de crecimiento de reorganizantes 6:2 recombinantes en células MDCK. Se infectaron células MDCK en placas de seis pocillos con A/Fujian, A/Sendai, A/Wyoming 6:2 y dos virus recombinantes modificados a una moi de 1,0. Después de 30 min de adsorción bien a 33°C o 4°C, las células infectadas bien se lavaron tres veces con PBS, o se recubrieron directamente con 3 ml de OptiMEM I que contenía 1 µg/ml de tripsina-TPCK y se incubaron a 33°C. Se fijó un conjunto de las placas infectadas con paraformaldehído al 1% a las 6 h después de la infección durante 15min a temperatura ambiente, y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 15 min seguido de análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales anti-NP. Las imágenes celulares capturadas con la cámara digital ORCA-100 mediante el programa informático de análisis de captura de imágenes y de intensidad dinámica Compix, Versión 5,3 (Crabberly Township, PA) para calcular el porcentaje de las células infectadas. Se incubó otro conjunto de placas a 33°C. En varios instantes de intervalos, se recogieron 250 µl de sobrenadante de cultivo y se almacenaron a -80°C en presencia de SPG antes de la titulación del virus. Después de retirar cada alícuota, se añadió a las células una cantidad igual de medio reciente. El título de virus en estas alícuotas se determinó mediante ensayo de placa en células MDCK a 33°C.

Para determinar si la diferencia de unión entre estos virus afectó a la cinética de crecimiento de virus en células MDCK, se incubaron las células MDCK infectadas a 33°C y se recogieron los sobrenadantes de cultivo en varios instantes para la titulación del virus. Cuando se adsorbió a 33°C, A/Fujian 6:2 tenía una cinética de crecimiento menor y un título más bajo (Fig. 2), A/Sendai, A/Fujian 6:2 con HA-V186I226 o HA-L183A226 se comportaron de manera similar a A/Wyoming 6:2. Cuando se efectuó la adsorción a 4°C, A/Fujian 6:2 así como A/Sendai 6:2 tenían cinéticas de crecimiento más lentas. A/Wyoming 6:2 y las dos variantes de A/Fujian crecieron de manera similar. Estos resultados fueron coherentes con el ensayo de unión de virus mientras que la etapa de lavado redujo la infección eficaz de A/Fujian a ambas temperaturas.

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

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

Las cepas de virus de la gripe A de tipo silvestre (wt), A/Fujian/411/02, A/Sendai-H/F4962/02 y A/Wyoming/03/03 se obtuvieron del Center for Disease Control (Atlanta, GA) y se amplificaron una vez en células MDCK o en huevos de pollo embrionados. Tal como se indica en la Tabla 20, se pasó A/Fujian solo tres veces en cultivo celular, mientras que A/Sendai y A/Wyoming se sometieron a 11 pases en huevos. Las secuencias de HA y NA de estas tres cepas se determinaron mediante secuenciación de los productos de RT-PCR usando ARNv extraído de estos virus. En la Tabla 1 se lista la diferencia en la secuencia de HA y NA de estas tres cepas de H3N2. A/Sendai fue idéntica a A/Fujian en su secuencia de aminoácidos de HA1, pero difirió en la secuencia de NA en tres posiciones de aminoácidos, 119, 146 y 347. A/Wyoming tenía la secuencia de NA idéntica a la de A/Fujian, pero difirió de la de A/Fujian y A/Sendai en HA1 en cuatro aminoácidos. Además, tanto A/Sendai como A/Wyoming tenían Glu-150 en lugar de Gly-150 en HA2. Después de un ciclo de amplificación en células MDCK, el resto 183 en HA1 de A/Fujian de wt mutó de His-183 a Leu-183 y fue difícil aislar al virus A/Fujian de wt con His-183, indicando que el virus con His-183 tenía una ventaja de crecimiento *in vitro*.

Estos tres virus de wt crecieron de manera diferente en células MDCK, alcanzando títulos de 6,1, 8,1 y 6,7 log₁₀ UFP/ml para A/Fujian de wt, A/Sendai de wt y A/Wyoming de wt, respectivamente. A/Fujian de wt se replicó mal en huevos, alcanzando un título de 4,1 log₁₀ UFP/ml (Tabla 20). El virus aislado en huevos tenía el cambio H183L en HA. Por el contrario, A/Sendai de wt y A/Wyoming de wt crecieron bien en huevos, teniendo títulos de 9,0 y 8,9 log₁₀ UFP/ml, respectivamente.

Para confirmar que los segmentos HA y NA de estas cepas de H3N2 controlaban la replicación del virus en huevos y células, se reorganizaron los segmentos génicos de HA y NA con los segmentos génicos internos de la cepa adaptada al frío A/Ann Arbor/6/60, el virus donante maestro para las vacunas de la gripe vivas atenuadas FluMist (VDM-A) para generar tres virus reorganizantes 6:2. La replicación de estos tres virus se evaluó en células MDCK y en huevos de gallina embrionados. A/Fujian 6:2 (6,2 log₁₀UFP/ml) mostró un título más bajo que A/Sendai 6:2 (7,1 log₁₀UFP/ml) y A/Wyoming (7,0 log₁₀UFP/ml) en células MDCK. De manera similar a A/Fujian de wt, A/Fujian 6:2 se replicó mal en huevos de gallina embrionados con un título de 4,1 log₁₀UFP/ml. Tanto A/Sendai 6:2 como A/Wyoming se replicaron a títulos mayores de 8,7 y 8,1 log₁₀UFP/ml, respectivamente. Por lo tanto, la transferencia de los segmentos génicos de HA y NA de wt en VDM-A no cambió la capacidad de cada virus para replicarse en huevos.

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

Cepas virales	Posiciones de aminoácidos							
	HA1 128	186	219	HA2 226	150	119	NA 136	347
A/Fujian/411/02 ⁽¹⁾ (C1/C2)	T	G	S	V	G	E	Q	H
A/Sendai-H/F4962/02 (Cx8/E3)	-	-	-	-	E	Q	K	Y
A/Wyoming/03/03 (ck2E2/E9)	A.	V	Y/F	I	E	-	-	-

Cepas virales (Historial de pases)	Título viral (log ₁₀ UFP/ml ± DT) ⁽³⁾			
	wt	6:2	wt 6:2	Huevos
A/Fujian/411/02 ⁽¹⁾ (C1/C2)	6,1 ± 0,3	6,2 ± 0,3 ⁽²⁾	4,1 ± 0,6	4,2 ± 0,5
A/Sendai-H/F4962/02 (Cx8/E3)	8,1 ± 0,2	7,1 ± 0,1	9,0 ± 0,3	8,7 ± 0,2
A/Wyoming/03/03 (ck2E2/E9)	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,4	8,9 ± 0,3	8,1 ± 0,1

⁽¹⁾ A/Fujian wt tenía el cambio H183L después de un solo pase en células MDCK y en huevos.

⁽²⁾ A/Fujian recombinante 6:2 contenía E150 en HA2.

⁽³⁾ Los títulos virales se expresaron como media de log₁₀UFP/ml ± DT a partir de dos o más muestras.

5 Efecto de cambios de aminoácidos en las actividades de neuraminidasa de NA y replicación de virus

A/Fujian difirió de A/Sendai en tres aminoácidos en NA, E119Q, Q136K y H347Y (Tabla 20), se baraja la hipótesis de que uno o más de estos cambios permitió que A/Sendai se replicase en huevos de gallina embrionados a un título mayor que A/Fujian. Las sustituciones de E119 por restos de G, D, A o V se han comunicado para varias cepas resistentes a fármacos anti-neuraminidasa que dieron como resultado actividad de neuraminidasa reducida. Para determinar si el cambio E119Q o cualquiera de los otros dos en NA tenían un efecto en la actividad de NA de A/Fujian y en su capacidad para replicarse en huevos de gallina embrionados, se introdujeron mutaciones por sustitución individuales y dobles en plásmidos de expresión de NA de A/Fujian y se midió la actividad de NA en las células HEp-2 transfectadas. Además, los virus recombinantes 6:2 que portaban mutaciones en el NA de A/Fujian se recuperaron también y se comparó su crecimiento en células MDCK y huevos (Tabla 21). A/Fujian (E119Q136H147) tenía una actividad de NA mayor en aproximadamente un 80% en comparación con la de A/Sendai (Q119K136Y147). La mutación individual Q119 tenía un 66% de actividad de NA, el cambio Y347 tenía un efecto mínimo en la actividad de NA pero K136 tenía solo un 25% de actividad. Las mutaciones dobles, K136Y347, Q119Y347, y Q119K136 tenían actividad de NA reducida a niveles del 29%, 52% y 25% de la de A/Fujian, respectivamente. Estos datos indicaron que estos tres restos de NA afectaron a la actividad de NA en el orden de K136>Q119>Y347.

Se examinó esta correlación de la actividad de NA de los mutantes de NA con replicación del virus en huevos de gallina embrionados (Tabla 21). Se demostró que los seis virus modificados se replicaban bien en células MDCK alcanzando títulos en el intervalo de 6,2 a 6,9 log₁₀UFP/ml, pero se replicaron de manera significativamente diferente en huevos. FJ-Q119 y FJ-347 que tenían una actividad de NA del 66% y 99% de A/Fujian fueron incapaces de crecer en huevos. FJ-K136, con una actividad de NA del 25%, fue capaz de crecer hasta un título de 4,8 log₁₀UFP/ml en huevos, pero a 4,0 log₁₀ menor que la de A/Sendai (8,8 log₁₀UFP/ml). Inesperadamente, aunque K136Y347 redujo de manera significativa la actividad de NA *in vitro*, el virus recombinante que portaba estas dos mutaciones (FJ-K136T347) no fue capaz de replicarse en huevos de gallina embrionados. Q119Y347, que tenía un 52% de actividad de NA, se replicó en huevos hasta un título de 4,5 log₁₀UFP/ml. Q119K136, que tenía una actividad de NA ligeramente mayor que la de A/Sendai se replicó hasta un título de 6,2 log₁₀UFP/ml pero seguía siendo 2,6 log₁₀ menor que la de A/Sendai. Estos resultados indicaron que cada uno de los tres restos de NA que difirieron entre A/Fujian y A/Sendai impactaron de manera diferente en la replicación del virus. Aunque varias mutaciones de NA pudieron reducir la actividad de NA a un nivel próximo al de A/Sendai, solamente los cambios Q136K y E119Q pudieron dar como resultado una mejora significativa en la replicación del virus en huevos de gallina embrionados. Ya que los dobles mutantes de Q119K136 no se replicaron de manera tan eficiente como el virus A/Sendai en huevos, el resto Y347 también podría afectar a la replicación del virus en huevos.

Tabla 21. Efectos de restos de NA en la replicación del virus en células MDCK y huevos embrionados.

NA	Restos de NA			Actividad de NA ⁽¹⁾	Título de Virus ⁽²⁾ (Media ± DT)	(Log ₁₀ UFP/ml)	
	119	136	347			MDCK	Huevos
A/Fujian	E	Q	H		100	6,5	<1,5
FJ-Q119	Q	-	-		66 ± 3	6,7	<1,5
FJ-Y347	-	-	Y		99 ± 1	6,6	<1,5
FJ-K136	-	K	-		25 ± 1	6,6	4,8
FJ-K136Y347	-	K	Y		29 ± 3	6,5	<1,5
FJ-Q119Y347	Q	-	Y		52 ± 4	6,6	4,5
FJ-Q119K136	Q	K	-		25 ± 1	6,2	6,2
A/SENDAI	Q	K	Y		21 ± 1	6,9	8,8

⁽¹⁾ Las actividades de NA en células HEp-2 transfectadas con ADNc de NA se expresaron como el porcentaje del de A/Fujian (media ± error estándar) a partir de cuatro experimentos independientes.

⁽²⁾ Se generaron virus recombinantes 6:2 usando HA y NA de A/Fujian o NA de A/Fujian con las mutaciones indicadas.

Efectos de restos de HA en la replicación del virus

Los cambios de los cuatro restos de HA1 en A/Wyoming/03/03 que diferían de A/Fujian se investigaron respecto de sus papeles en la replicación del virus. Las mutaciones por sustitución individuales y múltiples se introdujeron en ADNc de HA de A/Fujian y se introdujeron los plásmidos de HA en VDM-A junto con NA de A/Fujian. Todos los virus mutantes reorganizantes 6:2 se replicaron bien en células MDCK pero crecieron de manera diferente en huevos de gallina embrionados (Tabla 33). Los reorganizantes 6:2 con HA de A/Fujian (T128G186S219V226) fueron incapaces de replicarse en huevos. Un cambio individual de T128A no mejoró el crecimiento de virus en huevos. Sin embargo, el cambio individual G186V o V226I dio como resultado un aumento en la replicación del virus en huevos. Los cambios dobles de G186V y V226I en HA se replicaron eficazmente en huevos. Las sustituciones adicionales en los restos 128 y/o 219 no aumentaron significativamente la replicación del virus. Por lo tanto, un mínimo de dos cambios G186V y V226I permitieron que A/Fujian 6:2 creciese eficazmente en huevos de gallina embrionados.

TABLA 22. EFECTOS DE RESTOS DE HA EN LA REPLICACIÓN DE VIRUS EN HUEVOS EMBRIONADOS

Virus ⁽¹⁾	Restos de HA				Título de virus en huevos (log ₁₀ UFP/ml)
	128	186	219	226	
A/Fujian	T	G	S	V	<1,5
HA-A128	A.	-	-	-	<1,5
HA-V186	-	V	-	-	4,9
HA-I226	-	-	-	I	5,2
HA-V186I226	-	V	-	I	7,6
HA-V186Y219I226	-	V	Y	I	7,5
A/Wyoming	A	V	Y	I	7,3

⁽¹⁾ El virus recuperado de las células transfectadas contenía NA y HA de A/Fujian con los cambios de aminoácidos indicados.

Adaptación de A/Fujian/411/02 6:2

Para determinar si la cepa A/Fujian 6:2 podía adaptarse al crecimiento en huevos de gallina embrionados, se amplificó el virus en células MDCK seguido de su pase en huevos (Tabla 23). Cuando se inocularon 3,0 log₁₀UFP de virus en un huevo, se detectó menos de 2,0 log₁₀UFP/ml de virus en el fluido alantoico recogido. No pudieron recuperarse virus infecciosos después de los pases de este material. Durante el segundo experimento de pase, se aumentó la cantidad de virus inoculado en huevos de gallina embrionados hasta 5,9 log₁₀ UFP. Se detectó un título de 3,9 log₁₀UFP/ml en el fluido alantoico recogido (FJ-EP1) y un pase adicional en huevos aumentó el título de virus hasta 6,2 log₁₀UFP/ml (FJ-EP2). Un pase adicional en huevos (FJ-EP3) aumentó el título de virus hasta 8,2 log₁₀UFP/ml. El análisis de secuencia del virus FJ-EP2 reveló una mutación de A a U en el nucleótido 625 en el segmento de ARN de HA que dio como resultado un cambio de H183L en la proteína HA. El análisis adicional mostró que este cambio también sucedió durante la amplificación del virus en células MDCK. La mutación H183L también se encontró en HA de A/Fujian de wt durante su replicación en MDCK y huevos, tal como se ha descrito anteriormente. Se encontró una mutación de U a C adicional en el nucleótido 754 de HA dando como resultado una sustitución V226A en el virus FJ-EP3 amplificado (Tabla 23). No se detectaron cambios en el segmento de NA.

Para confirmar que las mutaciones H183L y V226A en HA eran de hecho responsables del aumento en la replicación de A/Fujian 6:2 en huevos, se introdujeron H183L y V226A en HA de A/Fujian HA de manera individual o en combinación. Se obtuvieron tres virus recombinantes y crecieron hasta un título de 7,4 log₁₀UFP/ml para FJ-H183L, 7,9 log₁₀UFP/ml para FJ-V226A y 8,4 log₁₀UFP/ml para FJ-H183L/V226A (Tabla 23). Por lo tanto, H183L y V226A contribuyeron independientemente a la replicación mejorada del virus A/Fujian en huevos de gallina embrionados.

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

Virus títulos (Log ₁₀ UFP/ml) Pasado en huevo	Mutaciones en nucleótido (aminoácido)	Virus
FJ-EP1	ND ¹	3,9
FJ-EP2	A625U (H183L)	6,2
FJ-EP3	A625U (H183L), U745C (V226A)	8,2
Recombinantes		
FJ-183L	A625T (H183L)	7,4
FJ-226A	T745C (V226A)	7,9
FJ-183L/226A	A625U (H183L), U745C (V226A)	8,4
No determinado		
<u>Propiedades de unión a receptor y replicación de virus recombinantes</u>		

A partir de los estudios anteriores, se demostró que los cambios de NA que redujeron la actividad de NA de A/Fujian eran suficientes para que este virus creciese en huevos. Por otra parte, los cambios de HA (V186V y V226I o H183L y V226A) podrían haber aumentado la afinidad de unión a receptor para compensar la mayor actividad de NA de A/Fujian. Para determinar si los cambios en la proteína HA de A/Fujian aumentaron su capacidad de unión a receptor, se comparó la adsorción de A/Fujian 6:2 que portaba el cambio HA-V186I226 y la de A/Fujian 6:2 adaptada a huevo que contenía los cambios HA-L183A226 con A/Fujian 6:2, A/Sendai, y A/Wyoming. Se adsorbió cada virus en células MDCK a una moi de 1,0 durante 30 min a 4°C o 33°C, se retiró el inóculo y las células infectadas se lavaron tres veces o se omitió la etapa de lavado. Después de 6 horas de incubación a 33°C, se determinó el porcentaje de células infectadas mediante análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-NP. Tal como se muestra en la Fig. 36, A/Fujian 6:2 y A/Sendai infectaron al 26-27% de células cuando se llevó a cabo la adsorción a 4°C, pero la mayoría de los virus se eliminaron fácilmente mediante la etapa de lavado. A 33°C, el lavado redujo en gran medida la infección de virus A/Fujian 6:2 (6,2% en comparación con el 37,8%) pero no tuvo un efecto significativo en la infección de A/Sendai 6:2 (42,8% en comparación con el 51,7%). Por el contrario, A/Wyoming 6:2, A/Fujian a HA-V186I226 o HA-L183A226 tuvieron una tasa de infección similar, independientemente de si las células se adsorbieron a 4°C o 33°C y con o sin una etapa de lavado. Estos datos indicaron que HA de A/Fujian y de A/Sendai tenían tan baja afinidad de unión que los virus unidos a 4°C podían eliminarse por lavado de las células fácilmente. La unión y la cinética de entrada del virus fueron más rápidas a 33°C, por lo tanto, la etapa de lavado tuvo un impacto mínimo en la infección por virus A/Sendai 6:2. Sin embargo, la mayoría de A/Fujian 6:2 se eliminó por lavado en condiciones similares debido a que su mayor actividad de NA evitó la unión eficaz del virus a 33°C (datos no mostrados).

Antigenicidad de virus recombinantes

Para examinar si los virus con los restos de HA y NA modificados afectaron a la antigenicidad del virus, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) usando sueros de hurón anti-A/Wyoming y anti-A/Sendai (Tabla 24). Los sueros de hurón anti-A/Wyoming o anti-A/Sendai tuvieron un título de HAI similar cuando se midió con virus A/Fujian 6:2 o A/Sendai. Un título de HAI ligeramente mayor se detectó con el virus A/Wyoming 6:2, probablemente debido a la mayor unión de HA de A/Wyoming al receptor de la célula en los glóbulos rojos sanguíneos. Los dos virus modificados (A/FujianHA-V186I226 y A/Fujian HA-L183A226) tuvieron un título de HAI similar a A/Wyoming cuando se midió mediante cualquier suero. Queda indicado que la diferencia de aminoácidos entre A/Sendai y A/Wyoming y los virus modificados en HA generados en el presente estudio no alteraron la antigenicidad del virus.

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

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

⁽¹⁾ Se creció A/Fujian en células MDCK y el resto de virus crecieron en huevos.

⁽²⁾ Se midió la antigenicidad mediante ensayo HAI usando suero de hurón inmunizado contra A/Wyoming (anti-AWY) o A/Sendai (anti-A/SD) con los antígenos del virus indicados

EJEMPLO 12: DETERMINACIÓN DE LOS LOCUS QUE CONTROLAN EL FENOTIPO DE ADAPTACIÓN AL FRÍO DEL VIRUS DE LA GRIPE B/ANN ARBOR/1/66

El virus adaptado al frío (*ca*) B/Ann Arbor/1/66 es el virus donante maestro (VDM-B) para las vacunas vivas atenuadas de gripe B Flumist®. Las vacunas de virus de la gripe B 6:2 que portaban los seis genes internos procedentes de B/Ann Arbor/1/66 *ca* y las glucoproteínas de superficie HA y NA a partir de las cepas de tipo silvestre se caracterizan por los fenotipos de adaptación al frío (*ca*), sensibilidad a la temperatura (*ts*) y atenuación (*att*). El análisis de secuencia reveló que VDM-B contiene nueve aminoácidos en las proteínas PB2, PA, NP y M1 que no se encuentran en las cepas de gripe B de tipo silvestre. Los presentes inventores han determinado que tres aminoácidos en PA(M431V) y NP(A114V, H410P) determinaron el fenotipo *ts* y, además de estos tres locus de *ts*, dos aminoácidos en M1 (Q159H, V183M) confirieron el fenotipo *att*.

Para entender la base molecular del fenotipo *ca*, se usó el sistema genético inverso basado en plásmidos para evaluar la contribución de estos nueve aminoácidos específicos de VDM-B para el fenotipo *ca*. VDM-B recombinante se replicó eficazmente a 25°C y 33°C en las células de riñón de pollo embrionario (CEK). Por el contrario, B/Ann Arbor/1/66 recombinante y de tipo silvestre, que contenía los nueve aminoácidos de tipo silvestre, se replicaron de manera ineficaz a 25°C. Se determinó que un total de cinco aminoácidos de tipo silvestre, uno en PB2 (R630S), uno en PA(M431 V) y tres en NP(A114V, H410P, T509A), fueron necesarios para revertir completamente el fenotipo *ca* de VDM-B. Además, el reemplazo de dos aminoácidos en la proteína M1 (Q159H, V183M) de VDM-B o cepas de vacuna 6:2 con los aminoácidos de tipo silvestre aumentaron significativamente la replicación del virus a 33°C pero no a 25°C en células CEK; el cambio V183M tuvo un impacto mayor en el cambio.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MedImmune Vaccines, Inc.
Hoffmann, Erich
Jin, Hong
Lu, Bin
Duke, Gregory
Kemble, George
Chen, Zhongying

<120> SISTEMA MULTIPLÁSMIDO PARA LA PRODUCCIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE

<130> FL210PCT2

<150> US 60/574.117
<151> 24-05-2004

<150> US 60/578.962
<151> 12-06-2004

<150> US 60/631.892
<151> 01-12-2004

<150> US 60/643.278
<151> 13-01-2005

<150> US 60/657.372
<151> 02-03-2005

<160> 102

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico polyA.1

<400> 1
aacaattgag atctcggtca cctcagacat gataagatac attgatgagt 50

<210> 2

<211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico polyA.2

<400> 2
 tataactgca gactagtgat atccttggtt attgcagctt ataatggta 50

10 <210> 3
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

20 <400> 3
 cacttatatt cacctgcctc agggagcgaa agcagggtc 38

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

30 <400> 4
 tattcgtctc agggagcgaa agcaggcaaa 30

<210> 5
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

40 <400> 5
 tattcgtctc agggagcgaa agcagggtact 30

<210> 6
 <211> 31
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

50 <400> 6
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggtag a 31

<210> 7
 <211> 38
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

<400> 7
 60 cacttatatt cacctgcctc agggagcaaa agcagggg 38

65 <210> 8
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

<400> 8
 tattcgtctc agggagcaaa agcaggagtg a 31

10 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

<400> 9
 tattcgtctc agggagcaaa agcaggtaga t 31

20 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

<400> 10
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggtga 30

30 <210> 11
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

40 <400> 11
 cctaacatat cacctgcctc gtattagtag aaacaaggtc gttt 44

<210> 12
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

50 <400> 12
 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggca ttt 33

55 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A

<400> 13
 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggta ctt 33

65 <210> 14
 <211> 33

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A
 5
 <400> 14
 atatcgtctc gtattagtag aaacaagggt att 33
 <210> 15
 10 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A
 <400> 15
 cctaacatat cacctgcctc gtattagtag aaacaagggt gtt 43
 20 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A
 <400> 16
 30 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggag ttt 33
 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A
 <400> 17
 40 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggta gtt 33
 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de VDM-A
 50 <400> 18
 atatcgtctc gtattagtag aaacaagggt gtt 33
 <210> 19
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 60 <400> 19
 gcaagctgtg gaaatatgca aggc 24
 <210> 20
 65 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 550 007 T3

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

5 <400> 20
 gccttgcata ttccacagc ttgc 24

<210> 21
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

15 <400> 21
 gaagtgccta cgggcaatct tcaaac 26

20 <210> 22
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

25 <400> 22
 gtttgaagat tgcccgaag cacttc 26

30 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

40 <400> 23
 cctgaggagg tcaagtgaac ac 22

45 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

50 <400> 24
 gtgtttcact gacctctca gg 22

55 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

60 <400> 25
 gtttgttagg actctattcc aac 23

65 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 550 007 T3

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

5 <400> 26
 gttggaatag agtcctaaca aac 23

10 <210> 27
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

20 <400> 27
 gacagtaagc tccgaacaca aatac 25

25 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

35 <400> 28
 gtatttgtgt tcggagcttc atgc 24

40 <210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

50 <400> 29
 cgaaccgaac ggctacattg aggg 24

55 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

65 <400> 30
 ccctcaatgt agccgttcgg ttcg 24

70 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

80 <400> 31
 cagagaaggt agatttgacg actg 24

85 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

90 <220>

<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 32
cagtcgtcaa agtctacctt ctctg 25

5

<210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 33
cactgaccca agacttgagc cac 23

15

<210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

25

<400> 34
gtggctcaag tcttgggtca gtg 23

30

<210> 35
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 35
caaagattaa aatgaaatgg ggaatg 26

40

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

45

<220>
<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 36
cattcccat ttcatttaa tctttg 26

50

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

55

<220>
<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 37
gtacctgtt tctactaata acccgg 26

60

<210> 38
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

65

<220>
<223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 38
 ccgggttatt agtagaaaca aggtac 26
 5 <210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 <400> 39
 ggaacacttg agaactgtga gacc 24
 15 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 <400> 40
 ggtctcacag ttctcaagtg ttcc 24
 25 <210> 41
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 <400> 41
 gaattttatc acaaagtga tgatgaatg 29
 35 <210> 42
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 <400> 42
 cattcatcat cacattgtg ataaaattc 29
 45 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 <400> 43
 gccagaatgc aactgaaatc agagc 25
 55 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A
 65

ES 2 550 007 T3

<400> 44
 gctctgattt cagtttcatt ctggc 25

5 <210> 45
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 45
 ccgaatgaga atccagcaca caag 24

15 <210> 46
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 46
 cttgtgtgct ggattctcat tcgg 24

25 <210> 47
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 47
 catcaatttc atgcctatat aagctttc 28

35 <210> 48
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 48
 gaaagcttat ataggcatga aattgatg 28

45 <210> 49
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 49
 cataatggat cctaacactg tgtcaagc 28

55 <210> 50
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A

<400> 50

ES 2 550 007 T3

	gcttgacaca gtgttaggat ccattatg	28
5	<210> 51 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A	
	<400> 51 ggagaataga ttcacgaga ttggag	26
15	<210> 52 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador oligonucleotídico para la corrección de la mutación de VDM-A	
	<400> 52 ctccaatctc gatgaatcta ttctcc	26
25	<210> 53 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca	
35	<400> 53 tattcgtctc agggagcaga agcggagcct ttaagatg	38
40	<210> 54 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca	
45	<400> 54 tattcgtctc gatgccgttc cttctcatt gaagaatgg	39
50	<210> 55 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca	
55	<400> 55 tattcgtctc ggcacctttg tcgcctggga tgatgatg	38
60	<210> 56 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca	
	<400> 56 atatcgtctc gtattagtag aaacacgagc ctt	33

ES 2 550 007 T3

5 <210> 57
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

 10 <400> 57
 tattcgtctc agggagcaga agcggagcgt ttcaagatg 40

 15 <210> 58
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

 <400> 58
 tattcgtctc tctcatttg ctcttttta atattcccc 39

 25 <210> 59
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

 <400> 59
 tattcgtctc atgagaatgg aaaaactact aataaattca gc 42

 35 <210> 60
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

 <400> 60
 atatcgtctc gtattagtag aaacacgagc att 33

 45 <210> 61
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

 <400> 61
 tattcgtctc agggagcaga agcgggtgcgt ttga 34

 55 <210> 62
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

 65 <400> 62
 tattcgtctc ccagggccct ttactgtgc agagtgc 37

ES 2 550 007 T3

5
 <210> 63
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca
 <400> 63
 10 tattcgtctc tcctggatct accagaaata gggccagac 39
 <210> 64
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca
 20 <400> 64
 atatcgtctc gtattagtag aaacacgtgc att 33
 <210> 65
 <211> 41
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca
 30 <400> 65
 tattcgtctc agggagcaga agcacagcat ttctaataat c 41
 <210> 66
 <211> 37
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca
 <400> 66
 atatcgtctc gtattagtag taacaagagc attttc 37
 45 <210> 67
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca
 <400> 67
 55 tattggtctc agggagcaga agcacagcat ttcttgt 38
 <210> 68
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca
 <400> 68
 65 atatggtctc gtattagtag aaacaacagc attttt 36
 <210> 69

ES 2 550 007 T3

<211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

<400> 69
 tattcgtctc agggagcaga agcagagcat cttctcaaaa c 41

10 <210> 70
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

20 <400> 70
 atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttttcag 39

<210> 71
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

30 <400> 71
 tattcgtctc agggagcaga agcacgcact ttctaaaat g 41

<210> 72
 <211> 40
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

40 <400> 72
 atatcgtctc gtattagtag aaacaacgca cttttccag 40

<210> 73
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

50 <400> 73
 tattcgtctc agggagcaga agcagaggat ttgttagtc 40

<210> 74
 <211> 38
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de B/Ann Arbor/1/66 ca

<400> 74
 65 atatcgtctc gtattagtag taacaagg atttttat 38

<210> 75
 <211> 39

ES 2 550 007 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la amplificación de NP de B/Yamanashi/166/98

<400> 75
 tattcgtctc agggagcaga agcacagcat ttcttggtg 39

10 <210> 76
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la amplificación de NP de B/Yamanashi/166/98

20 <400> 76
 atatcgtctc gtattagtag aaacaacagc attttttac 39

25 <210> 77
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la amplificación de NA de B/Yamanashi/166/98

35 <400> 77
 tattcgtctc agggagcaga agcagagca 29

40 <210> 78
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la amplificación de NA de B/Yamanashi/166/98

50 <400> 78
 atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttt 35

55 <210> 79
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8

65 <400> 79
 gaaagaagat tgaagaaatc cgaccgctc 29

70 <210> 80
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8

80 <400> 80
 gagcggctcg atttctcaa tcttcttc 29

85 <210> 81
 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 550 007 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8
 5
 <400> 81
 gaaataaaga aactgtgggg gcaaaccgt tcc 33
 <210> 82
 10 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8
 <400> 82
 ggaacgggtt tgccccaca gttctttat ttc 33
 20 <210> 83
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8
 <400> 83
 30 gtatgatgct gttacaaca cacactcc 28
 <210> 84
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8
 <400> 84
 40 ggagtgtgtt gttgaacag catcatac 28
 <210> 85
 <211> 29
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8
 50 <400> 85
 attgctgcta ggagcatagt gagaagagc 29
 <210> 86
 <211> 29
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para introducir mutaciones de ts en los genes PB1 y PB2 de PR8
 60 <400> 86
 gctcttctca ctatgctct agcagcaat 29
 <210> 87
 65 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de HA y NA

5 <400> 87
 tattcgtctc agggagcaga agcagagca 29

10 <210> 88
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para RT-PCR de HA y NA

20 <400> 88
 atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttt 35

25 <210> 89
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la extensión de cebadores

35 <400> 89
 atgttcttta cgatgcgatt ggg 23

40 <210> 90
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la extensión de cebadores

50 <400> 90
 cacttatatt cacctgcctc agggagcaaa agcagggg 38

55 <210> 91
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la extensión de cebadores

65 <400> 91
 cctaacaatat cacctgcctc gtattagtag aaacaagggt gtt 43

70 <210> 92
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico para la extensión de cebadores

80 <400> 92
 cacttatatt cacctgcctc agggagcaaa agcaggagt 39

85 <210> 93
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 550 007 T3

<220>

<223> cebador oligonucleotídico para la amplificación de NA

<400> 93

5 cctaacatat cacctgcctc gtattagtag aaacaaggag ttt 43

<210> 94

<211> 2836

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> pAD3000

15 <400> 94

```
ctagcagtta accggagtag tggctcgacct ccgaagttgg gggggaggag acggtaccgt 60
ctccaataac ccggcggccc aaaatgccga ctgggagcga aagatatacc tccccgggg 120
ccgggagggtc gcgtcaccga ccacgccgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg 180
tccccaaaaa cgccaccatc gcagccacac acgggagcgc cggggccctc tgggtcaacct 240
caggacacac gcgggagcag gcgggggccc gggacgccct cccggcgggtc acctcagaca 300
tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct 360
ttattttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac cattataagc tgcaataaac 420
aaggatctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc 480
tcttcgcctt cctcgcctac tgactcgcct gcctcggctc ttcggctgcg gcgagcggta 540
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 600
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgtctggcg 660
tttttcata ggctccgcc ccctgcgcag catcacaaaa atcgcgcctc aagtcagagg 720
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc cccctggaag ctccctcgtg 780
cgctctcctg ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 840
agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc 900
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccgg 960
aactatcgtc ttgagtccaa ccggtaaga cagcacttat cgcactggc agcagccact 1020
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg 1080
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 1140
accttcggaa aaagagttg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg 1200
ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 1260
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg 1320
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 1380
aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt 1440
gaggcaccta tctcagcag ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc 1500
gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgcctc aatgataccg 1560
cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1620
```

ES 2 550 007 T3

gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1680
gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 1740
ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 1800
tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct 1860
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1920
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1980
accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 2040
cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 2100
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 2160
cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 2220
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 2280
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 2340
tacatatctg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 2400
aaagtgccac ctgacgtcga tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 2460
tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac 2520
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg 2580
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg 2640
agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 2700
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg 2760
ctaactagag aaccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctataggag 2820
acccaagctg ttaacg 2836

<210> 95
<211> 2369
<212> ADN
<213> Virus de la gripe B

<400> 95

agcagaagcg gagcctttaa gatgaatata aatccttatt ttctcttcat agatgtaccc 60
atacaggcag caatttcaac aacattccca tacaccggtg ttccccetta ttcccatgga 120
acgggaacag gctacacaat agacaccgtg attagaacac atgagtactc aaacaaggga 180
aaacaataca tttctgatgt tacaggatgt gcaatggtag atccaacaaa tgggccatta 240
cccgaagata atgagccgag tgcctatgca caattggatt gcgttctgga ggctttggat 300
agaatggatg aagaacatcc aggtctgttt caagcagcct cacagaatgc catggaggga 360

ES 2 550 007 T3

```

ctaattggtca caactgtaga caaattaacc caggggagac agacttttga ttggacagtg 420
tgcagaaacc aacctgctgc aacggcactg aacacaacaa taacctcttt taggttgaat 480
gatttgaatg gagccgacaa ggggtggatta gtaccctttt gccaaagatat cattgattca 540
ttggacaaac ctgaaatgac tttcttctcg gtaaagaata taaagaaaaa attgcctgct 600
aaaaacagaa agggtttcct cataaagaga ataccaatga aggtaaaaga cagaataacc 660
agagtgggaat acatcaaaag agcattatca ttaaacacaa tgacaaaaga tgctgaaaga 720
ggcaactaa aaagaagagc aattgccacc gctgggatac aaatcagagg gtttgtatta 780
gtagttgaaa acttggctaa aaatatctgt gaaaatctag aacaaagtgg tttgccagta 840
ggtgggaaac agaagaaggc caaactgtca aatgcagtgg ccaaaatgct cagtaactgc 900
ccaccaggag ggatcagcat gacagtgaca ggagacaata ctaaattgaa tgaatgctta 960
aatccaagaa tctttttggc tatgactgaa agaataacca gagacagccc aatttggttc 1020
cgggattttt gtagtatagc accggtcttg ttctccaata aaatagccag attgggaaaa 1080
gggttcatga taacaagcaa aacaaaaaga ctgaaggctc aaataccttg tcccgatctg 1140
tttaatatat cattagaaag atataatgaa gaaacaaggc caaaattaaa aaagtgaaga 1200
ccattcttca atgaagaagg aacggcatct ttgtcgctg ggatgatgat gggaatgttt 1260
aatatgctat ctaccgtgtt gggagtagcc gcaactaggga tcaaaaacat tggaaacaaa 1320
gaatacttat gggatggact gcaatcttct gatgattttg ctctgtttgt taatgcaaaa 1380
gatgaagaga catgtatgga aggaataaac gatttttacc gaacatgtaa gctattggga 1440
ataaacatga gcaaaaagaa aagttactgt aatgaaactg gaatgtttga atttacaagc 1500
atgttctaca gagatggatt tgtatotaat tttgcaatgg aacttccttc atttggagtt 1560
gctggagtaa atgaatcagc agatatggca ataggaatga caataataaa gaacaatatg 1620
atcaacaatg ggatgggtcc agcaacagca caaacagcca tacaattatt catagctgat 1680
tatagataca cctacaaatg ccacagggga gattccaaag tgggaaggaaa gagaatgaaa 1740
attataaagg agctatggga aaacactaaa ggaagagatg gtctgttagt agcagatggt 1800
gggcctaaca tttaacaattt gagaaacttg catatcccag aaatagtatt aaagtacaac 1860
ctaattggacc ctgaatacaa agggcgggta ctgcacctc aaaatccctt tgtaggacat 1920
ttgtctattg agggcatcaa agaggcagat ataaccccag cacatggtcc agtaaagaaa 1980
atggactatg atgoggtatc tggaaactcat agttggagaa ccaaaaggaa cagatctata 2040
ctaaacactg atcagaggaa catgattctt gaggaacaat gctacgctaa gtgttgcaac 2100
ctttttgagg cctgttttaa cagtgcacat tacaggaaac cagtaggtca gcacagcatg 2160
cttgaggcta tggccacag attaagaatg gatgcacgac tagattatga atcaggaaga 2220
atgtcaaagg atgattttga gaaagcaatg gctcaccttg gtgagattgg gtacatataa 2280
gcttgaaga tgtctatggg gttattggc atcattgaat acatgcggta cacaaatgat 2340
taaaatgaaa aaaggctcgt gtttctact 2369

```

5 <210> 96
 <211> 2396
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B

10 <400> 96

ES 2 550 007 T3

```

agcagaagcg gagcgttttc aagatgacat tggccaaaat tgaattgtta aaacaactgt      60
taaggggacaa tgaagccaaa acggtattga aacaaacaac ggtagaccaa tataacataa     120
taagaaaatt caatacatca agaattgaaa agaacccttc attaaggatg aagtggggcca     180
tgtgttctaa ttttcccttg gctctgacca aggggtgatat ggcaaataga atccccttgg     240
aatacaaggg aatacaactt aaaacaaatg ctgaagacat aggaaccaa ggccaaatgt      300
gctcaatagc agcagttacc tgggtggaata catatggacc aataggagat actgaaggtt     360
tcgaaaaggt ctacgaaagc ttttttctca gaaagatgag acttgacaat gccacttggg     420
gccgaataac ttttggccca gttgaaagag tgagaaaaag ggtactgcta aaccctctca     480
ccaaggaaat gcctccagat gaagcgagca atgtgataat ggaaatattg ttccctaag      540
aagcaggaat accaagagaa tctacttgga tacataggga actgataaaa gaaaaaagag     600
aaaaattgaa aggaacgatg ataactccca ttgtactggc atacatgctt gagagagaac     660
tggttgcccg aagaagggtc ctgccagtgg caggagcaac atcagccgag ttcatagaaa     720
tgctacactg cttacaaggt gaaaattgga gacaaatata tcaccagga gggaataaac     780
taactgaatc taggtotcaa tcaatgattg tagctttagt aaaaataatc agaagatcaa     840
tagtgcacac aaaccacta gagctagctg tagaaattgc aaacaagact gtgatagata     900
ctgaaccttt aaaatcatgt ctggcagcca tagacggagg tgatgtagcc tgtgacataa     960
taagagctgc attaggacta aagatcagac aaagacaaag atttgacggc cttgaactaa    1020
agagaatatc aggaagagga ttcaaaaatg atgaagaaat attaatcggg aacggaacaa    1080
tacagaaaat tggaatatgg gacggagaag aggagtcca tgtaagatgt ggtgaatgca    1140
ggggaatatt aaaaaagagc aaaatgagaa tggaaaaact actaataaat tcagccaaaa    1200
aggaggacat gaaagattta ataattttgt gcattggtatt ttctcaagac actaggatgt    1260
tccaaggagt gagaggagaa ataaattttc ttaatcgagc aggccaactt ttatctccaa    1320
tgtaccaact ccagcgatat tttttgaata ggagcaacga cttttttgat caatgggggt    1380
atgaggaatc acccaaagca agtgaactac atgggataaa tgaattaatg aatgcatctg    1440

```

ES 2 550 007 T3

actatacggtt gaaaggggtt gtagtaacaa aaaatgtgat tgatgacttt agttctactg 1500
 aaacagaaaa agtatctata acaaaaaatc ttagtttaaat aaaaaggact ggggaagtca 1560
 taatgggggc taatgacgta agtgaattag aatcacaagc acagctaattg ataacatatg 1620
 atacacctaa gatgtgggag atgggaacaa ccaagaact ggtgcaaac acctaccaat 1680
 gggtgctaaa aaatttggtg aactgaagg ctgagtttct tctgggaaa gaagacatgt 1740
 tccaatggga tgcatttgaa gcatttgaaa gcataatccc ccagaagatg gctggccagt 1800
 acagtggatt tgcaagagca gtgctcaaac aaatgagaga ccaagagggt atgaaaactg 1860
 accagttcat aaagtgttg cttttctgtt tctcaccacc aaaattaagg agaaatgggg 1920
 agccttatca attcttgagg cttatgttga agggaggagg gaaaaatttc atcgaagtaa 1980
 ggaaaggggc ccctctattc tctacaatc cacaacaga agtcctaact atatgaggca 2040
 gaatgatgtc attaaaagga aaaattgaag atgaagaaag gaatagatca atggggaatg 2100
 cagtattggc aggccttctc gttagtggca agtatgacc agatcttgga gatttcaaaa 2160
 ctattgaaga acttgaagaa ctaaaaccgg gggaaaaagc aaacatctta ctttatcaag 2220
 gaaagcccg taaagtagtt aaaaggaaaa gatatagtgc tttatccaat gacatttcac 2280
 aaggaattaa gagacaaaga atgacagttg agtccatggg gtgggccttg agctaataa 2340
 aatttatcca ttaattcaat agacacaatt gagtgaaaaa tgctcgtgtt tctact 2396

<210> 97
 <211> 2308
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B

<400> 97

agcagaagcg gtgcgtttga tttgccataa tggatacttt tattacaaga aacttcaga 60
 ctacaataat acaaaaggcc aaaaacacaa tggcagaatt tagtgaagat cctgaattac 120
 aaccagcaat gctattcaac atctgcgtcc atctggaggc ctgctatgta ataagtata 180
 tgaatcttct tgatgaagaa ggaacacat atacagcatt agaaggacaa ggaagaagc 240
 aaaacttgag accacaatat gaagtgattg aggggaatgcc aagaacata gcatggatgg 300
 ttcaaagatc cttagcccaa gagcatggaa tagagactcc aaggatatct gctgatttgt 360
 tcgattataa aaccaagagg tttatagaag ttggaataac aaagggattg gctgacgatt 420
 acttttgaa aaagaagaa aagctgggga atagcatgga actgatgata ttcagctaca 480
 atcaagacta ttcgttaagt aatgaatcct cattggatga ggaaggaaaa gggagagtgc 540
 taagcagact cacagaactt caggctgagt taagtctgaa aaatctatgg caagttctca 600
 taggagaaga agatattgaa aaaggaattg acttcaaact tggacaaaca atatctaaac 660

ES 2 550 007 T3

```

taagggatat atctgttcca gctggtttct ccaattttga aggaatgagg agctacatag 720
acaatataga tcctaaagga gcaatagaga gaaatctagc aaggatgtct cccttagtat 780
cagttacacc taaaagttg aaatgggagg acctaagacc aatagggcct cacatttaca 840
accatgagct accagaagtt ccatataatg cctttcttct aatgtctgat gagttggggc 900
tggctaatat gactgaaggg aagtccaaga aaccgaagac cttagccaaa gaatgtctag 960
aaaagtactc aacactacgg gatcaaaactg acccaatatt aataatgaaa agcgaaaaag 1020
ctaacgaaaa cttcttatgg aagctgtgga gggactgtgt aaatacaata agtaatgagg 1080
aaacaagtaa cgaattacag aaaaccaatt atgccaaagt ggccacagga gatggattaa 1140
cataccagaa aataatgaaa gaagtagcaa tagatgacga aacaatgtac caagaagagc 1200
ccaaaatacc taacaaatgt agagtggctg cttgggttca aacagagatg aatctattga 1260
gcactctgac aagtaaaagg gccctggatc taccagaaat agggccagac gtagcaccca 1320
tggagcatgt agggagtga agaaggaaat actttgttaa tgaaatcaac tactgtaagg 1380
cctctaccgt tatgatgaag tatgtacttt ttcacacttc attattaaat gaaagcaatg 1440
ccagcatggg aaaaataaaa gtaataccaa taaccaacag agtagtaa at gaaaaaggag 1500
aaagttttga catgcttcat ggtctggcgg ttaaagggca atctcatctg aggggagata 1560
ctgatgttgt aacagttgtg actttcgaat ttagtagtac agatccaga gtggactcag 1620
gaaagtggcc aaaaataact gtatttagaa ttggctcctt atttgtgagt ggaagggaaa 1680
aatctgtgta cctatattgc cgagtgaatg gtacaaataa gatccaaatg aaatggggaa 1740
tggaagctag aagatgtctg cttcaatcaa tgcaacaaat ggaagcaatt gttgaacaag 1800
aatcatcgat acaaggatat gacatgacca aagcttggtt caaggagagac agagtgaata 1860
gtcccaaaac tttcagtatt gggactcaag aaggaaaact agtaaaagga tcctttggga 1920
aagcactaag agtaatatc accaaatggt tgatgcacta tgtatttgga aatgccaat 1980
tggaggggtt tagtgccgaa tctaggagac ttctactggt aattcaggca ttaaaggaca 2040
gaaagggccc ttgggtattc gacttagagg gaatgtattc tggaatagaa gaatgtatta 2100
gtaacaaccc ttgggtaata cagagtgcac actggtttta tgaaatgggt ggctttgaaa 2160
aagaggggag taaagtatta gaatcaatag atgaaataat ggatgaatga aagaagggca 2220
tagcgtctaa tttggtaata ttttgttcat tatgtatcta aacatccaat aaaaagaatt 2280
gagaattaaa aatgcacgtg tttctact 2308

```

<210> 98
 <211> 1884
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B
 <400> 98

ES 2 550 007 T3

```

agcagaagca gagcattttc taatatccac aaaatgaagg caataattgt actactcatg      60
gtagtaacat ccaatgcaga tcgaatctgc actgggataa catcgtcaaa ctcaccccat      120
gtggtcaaaa ctgctactca aggggaagtc aacgtgactg gtgtgatacc actgacaaca      180
acacctacca aatctcattt tgcaaatctc aaaggaacac agaccagagg gaaactatgc      240
ccaaactgtc tcaactgcac agatctggac gtggccttgg gcagaccaa gtgtatgggg      300
accatacctt cggcaaaagc ttcaatactc cacgaagtca aacctgttac atctgggtgc      360
tttcctataa tgcacgacag aacaaaaatc agacagctac ccaatcttct cagaggatat      420
gaaaaatatca ggttatcagc ccgtaacggt atcaacgcag aaacggcacc aggaggaccc      480
tacatagttg gaacctcagg atcttgccct aacgttacca atgggaaagg attcttcgca      540
acaatggcctt gggctgtccc aaaaaacaac aaaacccaaa cagcaacgaa ccattaaca      600
gtagaagtac catacatttg tacaaaagga gaagaccaa ttactgtttg ggggttccat      660
tctgatgacg aaacccaaat ggtaacactc tatggagact cgaagcctca aaagttcacc      720
tcacttgcca acggagtaac cacacattat gtttctcaga ttggtggcct cccaaatcaa      780
acagaagacg aagggtcacc acaaagcggc agaattgttg ttgattacat ggtgcaaaaa      840
cctggaaaaa caggaacaat tgtctatcaa agagggtgtt tattgcctca aaaagtgtgg      900
tgcgcaagtg gcaggagcaa ggtaataaaa ggggccttgc ctttaattgg tgaagcagat      960
tgcctccacg aaaaatacgg tggattaaac aaaagcaagc cttactacac aggagaacat     1020
gcaaaagcca taggaaattg cccaatatgg gtgaaaacac ccttgaagct ggccaatgga     1080
accaaatata gacctcctgc aaaactatta aaggaaaggg gtttcttcgg agctattgct     1140
ggtttcttgg aaggaggatg ggaaggaatg attgcagggt ggcacggata cacatctcat     1200
ggagcacatg gagtggcagt ggcagcagac cttaagagta cgcaagaagc tataaacaag     1260
ataacaaaaa atctcaattc tttaagttag ctagaagtaa agaattctca aagactaagc     1320
ggtgcaatgg atgaactcca caacgaaata ctcgagctgg atgagaaagt ggatgatctc     1380
agagctgata caataagctc gcaaatagag cttgcagtct tgctttccaa cgaaggaata     1440
ataaacagtg aagatgagca tctcttgga cttgaaagaa aactgaagaa aatgctgggc     1500
ccctctgctg tagacatagg gaatggatgc ttcgaaacca aacacaaatg caaccagact     1560
tgcttagaca ggatagctgc tggcaccttt aatgcaggag aattttctct tcccactttt     1620
gattcactaa atattactgc tgcactttta aatgatgatg gattggataa tcatactata     1680
ctgctctact actcaactgc tgcttctagt ttggctgtaa cattgatgat agctatcttt     1740
attgtttata tggctccag agacaatgtt tcttgctcca tctgtctata aggaaaaatta     1800
agccctgtat tttcctttat tgtagtgctt gtttgcttgt caccattaca aaaaacgtta     1860
ttgaaaaatg ctcttggttac tact                                           1884

```

5 <210> 99
 <211> 1842
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B

10 <400> 99

ES 2 550 007 T3

```

agcagaagca cagcattttc ttgtgaactt caagtaccaa caaaaactga aaatcaaaat      60
gtccaacatg gatattgacg gcatcaacac tggacaatt gacaaaacac cagaagaat      120
aacttccgga accagtgggg caaccagacc aatcatcaaa ccagcaaccc ttgccccacc      180
aagcaacaaa cgaacccgaa acccatcccc ggaaagggca gccacaagca gtgaagctga      240
tgtcggaag agaacccaaa agaaacaaac ccgcacagag ataaagaaga ggcgtctacaa      300
tatggtagtg aaactgggtg aattctacaa ccagatgatg gtcaaagctg gactcaacga      360
tgacatggag agaaacctaa tccaaaatgc acatgctgcg gaaagaattc tattggctgc      420
tactgatgac aagaaaactg aattccaaaa gaaaaagaat gccagagatg tcaaagaagg      480
gaaagaagaa atagaccaca acaaacacagg aggcaccttt tacaagatgg taagagatga      540
taaaaccatc tacttcagcc ctataagaat taccttttta aaagaagagg tgaaaacaat      600
gtacaaaacc accatgggga gtgatgggtt cagtggacta aatcacatca tgattgggca      660
ttcacagatg aacgatgtct gtttccaaag atcaaaaggca ctaaaaagag ttggacttga      720
cccttcatta atcagtactt ttgcaggaag cactctccc agaagatcag gtgcaactgg      780
tgttgcgatc aaaggagggtg gaactttagt ggcagaagcc attcgattta taggaagagc      840
aatggcagac agagggtctat tgagagacat cagagccaag acggcctatg aaaagattct      900
tctgaatctg aaaaacaagt gctctcgcc ccaacaaaag gctctagttg atcaagtgat      960
cggaagtaga aatccaggga ttgcagacat agaagaccta accctgcttg cccgaagcat     1020
ggtcgttgtc aggcctctct tagcgagcaa agtggtgctt cccataagca tttatgccaa     1080
aatacctcaa ctaggggttca atgttgaaga atactctatg gttgggtatg aagccatggc     1140
tctttataat atggcaacac ctgtttccat attaagaatg ggagacgatg caaaagataa     1200
atcacaatta ttcttcatgt cttgcttcgg agctgcctat gaagacctaa gagttttgtc     1260
tgcactaaca ggcacagaat tcaagcatag gtcagcatta aagtgaagg gtttccacgt     1320
tccagcaaag gagcaagtgg aaggaatggg ggcagctctg atgtccatca agctccagtt     1380
ttgggctcca atgaccagat ctggggggaa tgaagtaggt ggagacggag ggtctggtca     1440
aataagttgc agccccgtgt ttgcagtaga aagacctatt gctctaagca agcaagctgt     1500
aagaagaatg ctgtcaatga atattgaggg acgtgatgca gatgtcaaag gaaatctact     1560
caagatgatg aatgattcaa tgactaagaa aaccaatgga aatgctttca ttgggaagaa     1620
aatgtttcaa atatcagaca aaaacaaaac caatcccatt gagattccaa ttaagcagac     1680
catcccaat ttcttctttg ggaggagac agcagaggat tatgatgacc tcgattatta     1740
aagcaacaaa atagacacta tggctgtgac tgtttcagta cgtttggaat gtgggtgttt     1800
acttttattg aaataaatgt aaaaaatgct gttgtttcta ct                        1842

```

5 <210> 100
 <211> 1557
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B

10 <400> 100

ES 2 550 007 T3

```

agcagaagca gagcatcttc tcaaaactga agcaaatagg ccaaaaatga acaatgctac      60
cttcaactat acaaacgtta accctatttc tcacatcagg gggagtgtta ttatcactat      120
atgtgtcagc ttactgttca tacttattgt attcggatat attgctaaaa ttttcaccaa      180
caaaaataac tgcaccaaca atgtcatttg attgcgcgaa cgtatcaaat gttcaggctg      240
tgaaccgttc tgcaacaaaa gagatgacat ttcttctccc agagccggag tggacatacc      300
ctcgtttatc ttgccagggc tcaacotttc agaaagcact cctaattagc cctcataggt      360
tcggagaaac cagaggaaac tcagctccct tgataataag ggaacccttt gttgcttggt      420
gaccaaagga atgcagacac tttgctctaa cccattatgc agctcaacca gggggatact      480
acaatggaac aagaaaggac agaacaagc tgaggcatct gatttcagtc aaattaggca      540
aaatcccaac tgtagaaaa tccattttcc acatggcagc ttggagtggg tccgcatgcc      600
atgatggtag agaattggaca tatatcggag ttgatggccc tgacagtaat gcaactgatca      660
aaataaaata tggagaagca tatactgaca cataccattc ctatgcaaac aacatcctaa      720
gaacacaaga aagtgcctgc aattgcatcg ggggagattg ttatcttatg ataactgatg      780
gctcagcttc aggaattagt aaatgcagat ttcttaaaat tcgagagggg cgaataataa      840
aagaaatatt tccaacagga agagtagagc atactgaaga atgcacatgc gggttcgcca      900
gcaataaaac catagaatgt gcctgtagag ataacagtta cacagcaaaa agacccttg      960
tcaaatataa tgtggagact gatacagctg aaataagatt gatgtgcaca gagacttatt     1020
tggacacccc cagaccagat gatggaagca taacagggcc ttgcgaatct aatggggaca     1080
aagggtcttg aggcatacaa ggaggatttg tccatcaaag aatggcatct aagattggaa     1140
gatggtactc ccgaacgatg tctaaaactg aaagaatggg gatggaactg tatgtcaagt     1200
atgatggaga cccatggact gacagtgcgc cccttgctcc tagtggagta atgggttcaa     1260
tgaaaagaacc tggttggtat tcttttggtc tcgaaataaa agataagaaa tgtgatgtcc     1320
cctgtatttg gatagagatg gtacacgatg gtggaaaaga gacttggcac tcagcagcaa     1380
cagccattta ctgtttgatg ggctcaggac aattgctatg ggacactgtc acaggtgttg     1440
atatggctct gtaatggagg aatgggtgaa tctgttctaa accctttgtt cctattttgt     1500
ttgaacaatt gtccttactg gacttaattg tttctgaaaa atgctcttgt tactact      1557

```

5 <210> 101
 <211> 1190
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B

10 <400> 101

ES 2 550 007 T3

```

agcagaagca cgcactttct taaaatgtcg ctgtttggag acacaattgc ctacctgctt      60
tcactaacag aagatggaga aggcaaagca gaactagcag aaaaattaca ctgttgggtc      120
ggtgggaaag aatttgacct agactctgct ttggaatgga taaaaaaca aagatgccta      180
actgatatac aaaaagcact aattggtgcc tctatctgct ttttaaacc caaagaccaa      240
gaaagaaaaa gaagattcat cacagagccc ctgtcaggaa tgggaacaac agcaacaaaa      300
aagaaaggcc tgattctagc tgagagaaaa atgagaagat gtgtgagttt tcatgaagca      360
tttgaaatag cagaaggcca tgaaagctca gcactactat attgtctcat ggtcatgtac      420
ctgaaccctg gaaattattc aatgcaagta aaactaggaa cgctctgtgc tttatgcgag      480
aaacaagcat cacattcaca aagagctcat agcagagcag caagatcttc agtgcctgga      540
gtgaggcgag aaatgcagat ggtttcagct gtgaacacag caaaaacaat gaatggaatg      600
gggaagggag aagacgtcca aaaactggca gaagagctgc aaagcaacat tggagtattg      660
agatctctgg gggcaagtca aaagaatgga gaaggaattg caaaggatgt aatggaagtg      720
ctaaagcaga gctctatggg aaattcagct cttgtgaaga aataacctata atgctogaac      780
catttcagat tctttcaatt tgttctttca ttttatcagc tctccatttc atggcttggg      840
caatagggca tttgaatcaa ataaaaagag gagtaaacct gaaaatacga ataagaaatc      900
caaataaaga gacaataaac agagagggtat caattttgag acacagttac caaaaagaaa      960
tccaagccaa agaaacaatg aagggaagtac tctctgacaa catggagata ttgagtgacc     1020
acatagtaat tgaggggctt tctgctgaag agataataaa aatgggtgaa acagttttgg     1080
aggtagaaga attgcagtaa acccaatttt caccgtattt cttgctatgc atttaagcaa     1140
attgtaatca atgtcagcaa ataaactgga aaaagtgcgt tgtttctact     1190

```

<210> 102
 <211> 1098
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe B

 <400> 102

ES 2 550 007 T3

```

agcagaagca gaggatttgt ttagtcactg gcaaacggaa aaaaatggcg gacaacatga      60
ccacaacaca aattgaggta ggtccgggag caaccaatgc caccataaac tttgaagcag      120
gaattctgga gtgctatgaa aggctttcat ggcaaagagc ccttgactac cctgggtcaag      180
acgcctaaaa cagactaaag agaaaattag aatcaagaat aaagactcac aacaaaagtg      240
agcctgaaag taaaaggatg tctcttgaag agagaaaagc aattggggta aaaatgatga      300
aagtgtctct atttatgaat ccactgtctg gaattgaagg gtttgagcca tactgtatga      360
aaaattcctc aaatagcaac tgtccaaact gcaattggac cgattaccct ccaacaccag      420
gaaagtgcct tgatgacata gaagaagaac cggagaatgt tgatgacca actgaaatag      480
tattgaggga catgaacaac aaagatgcaa ggcaaaagat aaaggaggaa gttaaacactc      540
agaaagaagg gaagttccgt ttgacaataa aaagggatat acgtaatgtg ttgtccttga      600
gagtgttggt aaacggaaca ttcctcaagc accctaattg atacaagtcc ttatcaactc      660
tgcatagatt gaatgcatat gaccagagtg ggaggcttgt tgctaaactt gttgctactg      720
atgatcttac agtgagggat gaagaagatg gccatcggat cctcaactca ctcttcgagc      780
gttttaatat aggacattca aagccaattc gagcagctga aactgcggtg ggagtcttat      840
ccaatttgg tcaagagcac cgattatcac cagaggaggg agacaattag actggttacg      900
gaagaacttt atcttttaag taaaagaatt gatgataaca tattgttcca caaaacagta      960
atagctaaca gctccataat agctgacatg attgtatcat tatcattatt ggaaacattg     1020
tatgaaatga aggatgtggt tgaagtgtac agcaggcagt gcttgtgaat ttaaaataaa     1080
aatcctcttg ttactact                                     1098

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la replicación de un virus de la gripe reorganizante, comprendiendo el método las etapas de:
 - i) comparar la secuencia de aminoácidos del virus de la gripe reorganizante con la secuencia de aminoácidos de un virus de la gripe diferente, creciendo dicho virus de la gripe diferente en huevos embrionados;
 - ii) alterar uno o más aminoácidos en un polipéptido de HA de H3N2 del virus reorganizante para que coincida con la secuencia del virus de la gripe diferente que comprende sustituir según sea necesario los restos de aminoácidos de H3 de HA siempre que la posición 183 sea una leucina y la posición 226 sea una alanina, produciendo de este modo un virus reorganizante alterado; y
 - iii) crecer el virus reorganizante alterado en huevos, mediante lo que la replicación del virus reorganizante alterado aumenta en al menos un 10% en comparación con la replicación de virus reorganizante no alterado.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el virus reorganizante alterado es un virus reorganizante 6:2.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el virus reorganizante alterado es un virus reorganizante 7:1.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el virus reorganizante alterado está atenuado, es sensible a la temperatura y/o está adaptado al frío.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus de la gripe reorganizante comprende un polinucleótido de una cepa de virus A/Ann Arbor/6/60.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus de la gripe reorganizante comprende un polinucleótido de una cepa de virus B/Ann Arbor/1/66.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la replicación del virus de la gripe reorganizante alterado aumenta en al menos un 20% en comparación con la replicación de virus reorganizante no alterado.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la replicación del virus de la gripe reorganizante alterado aumenta en al menos un 40% en comparación con la replicación de virus reorganizante no alterado.
9. Un virus de la gripe reorganizante con replicación potenciada que comprende una proteína HA de H3N2 que comprende una leucina en la posición 183 y una alanina en la posición 226.
10. El virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de la reivindicación 9, que es un virus reorganizante 6:2.
11. El virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de la reivindicación 9, que es un virus reorganizante 7:1.
12. El virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que está atenuado, es sensible a la temperatura y/o está adaptado al frío.
13. El virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende un polinucleótido de un virus de una cepa A/Ann Arbor/6/60.
14. El virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende un polinucleótido de un virus de una cepa B/Ann Arbor/1/66.
15. Una composición inmunogénica que comprende el virus de la gripe reorganizante de replicación potenciada de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.

pAD3000 (SEC ID N° :94)

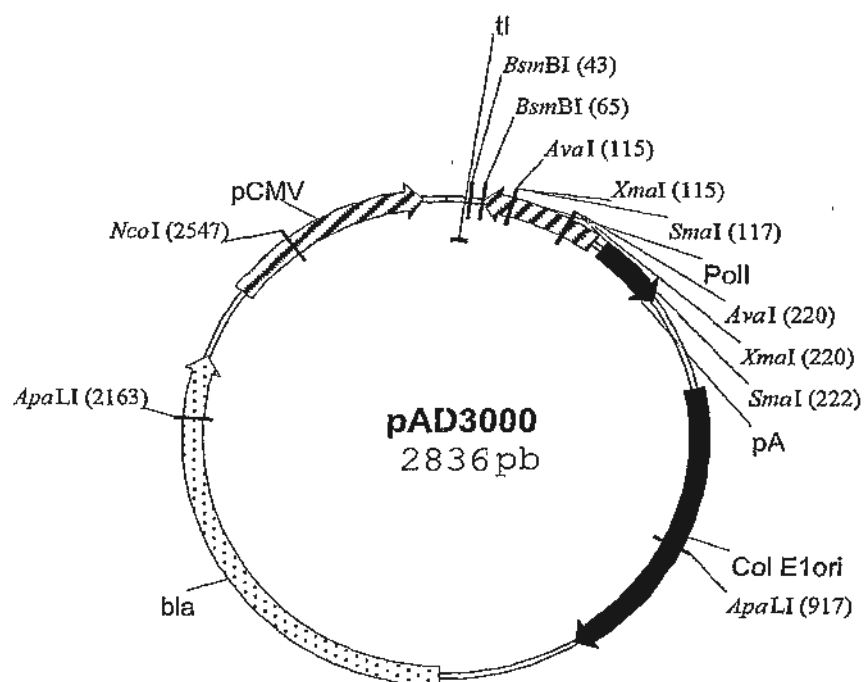


Fig. 1

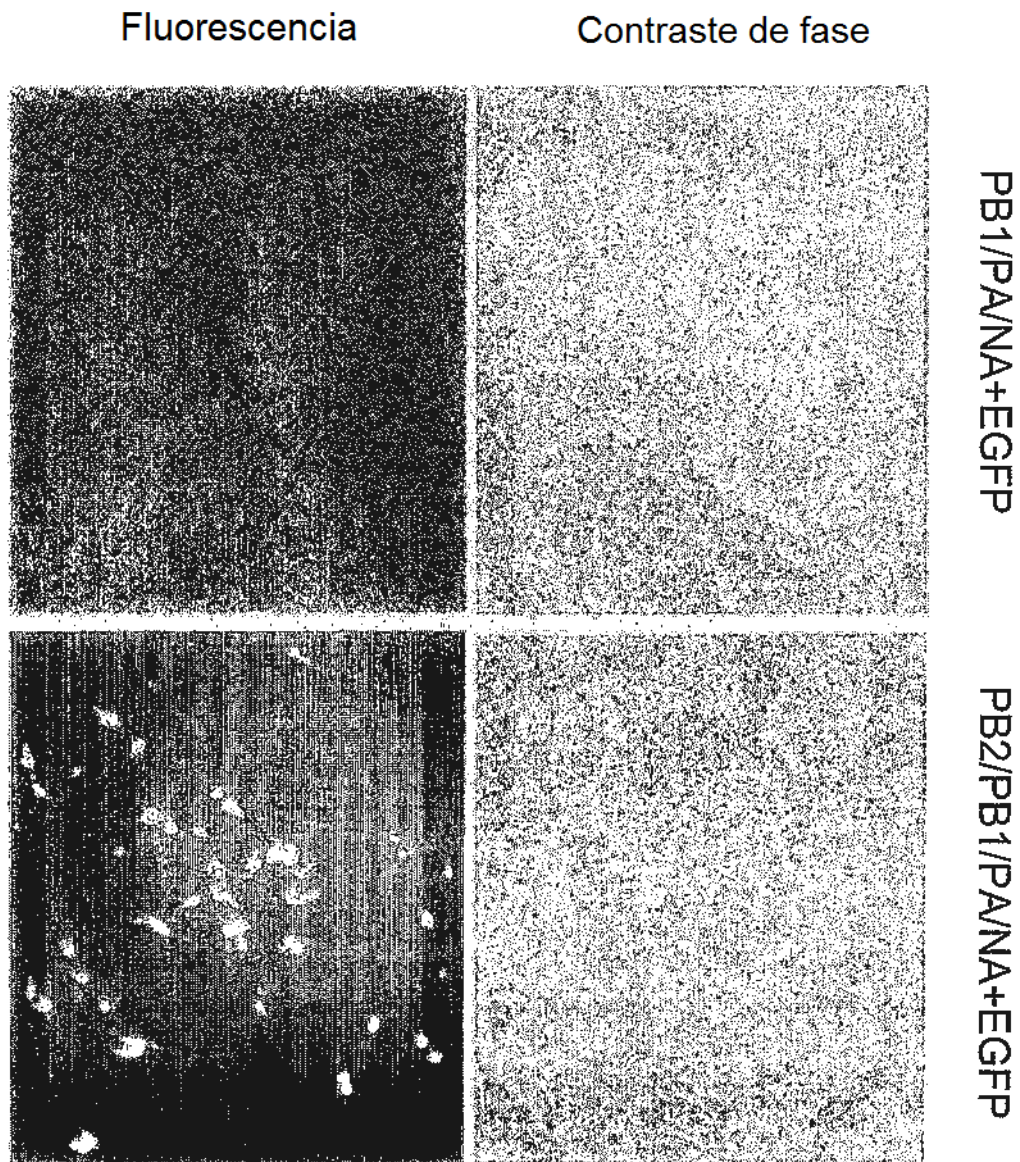


Fig. 2

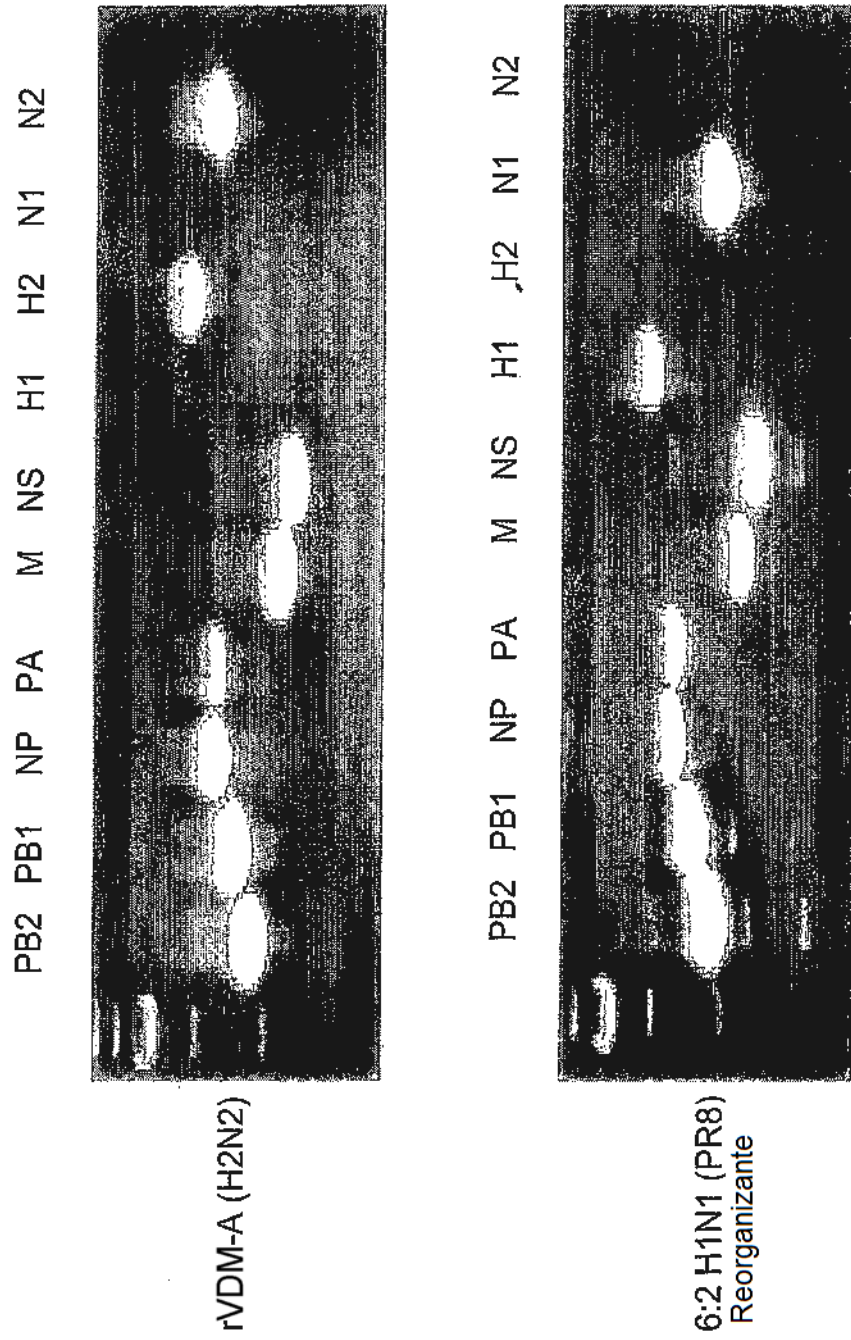


Fig. 3

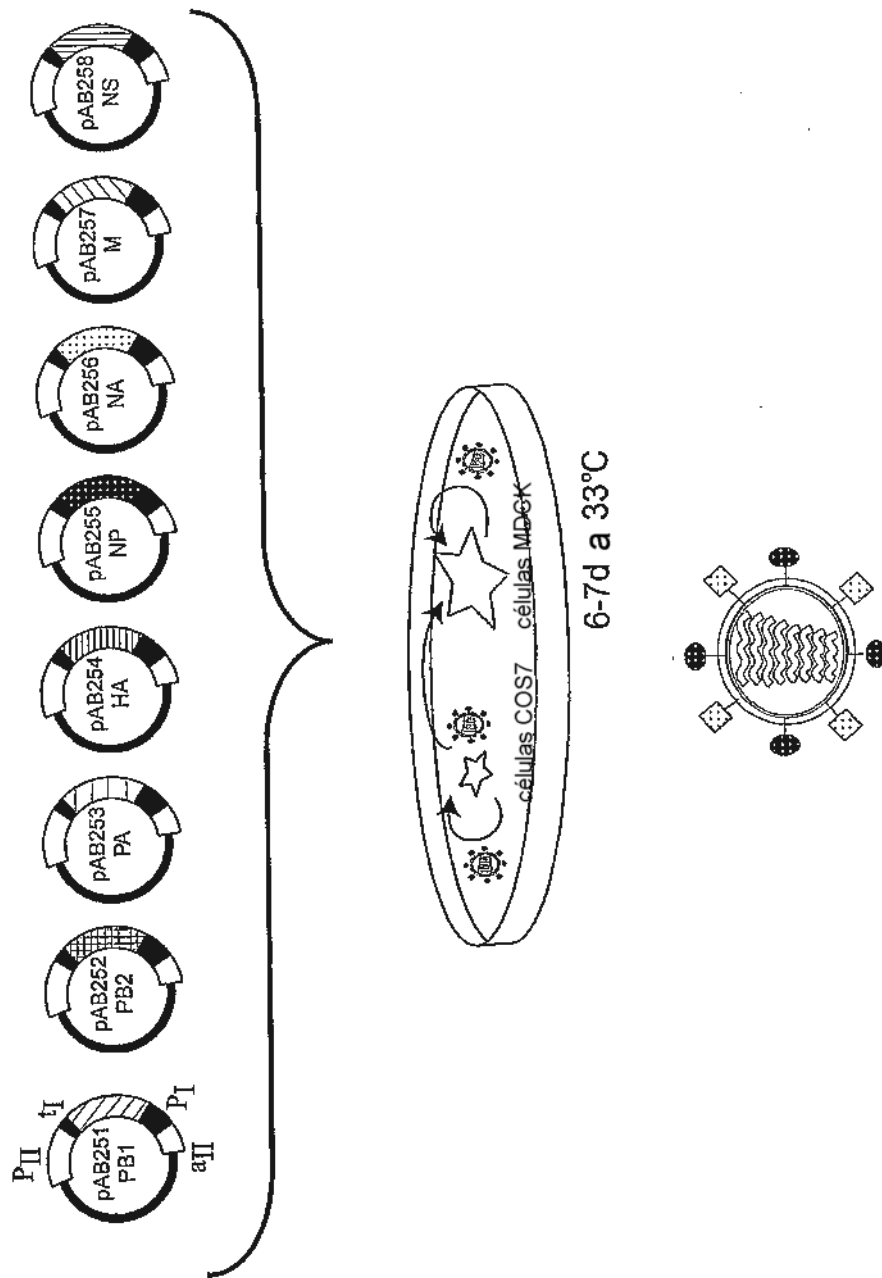


Fig. 4

Fig. 5A

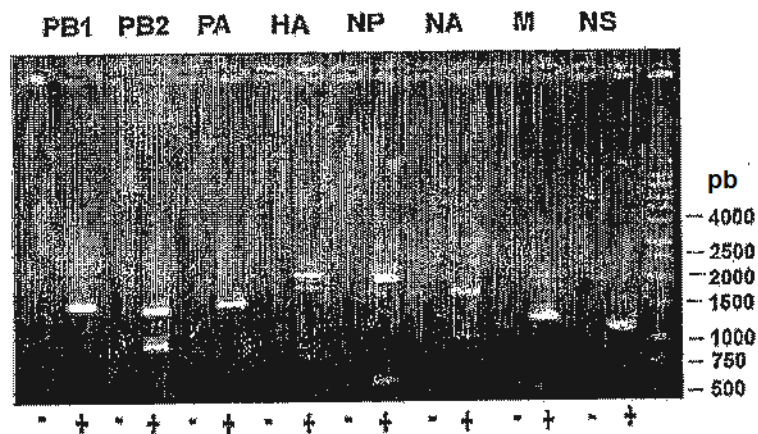
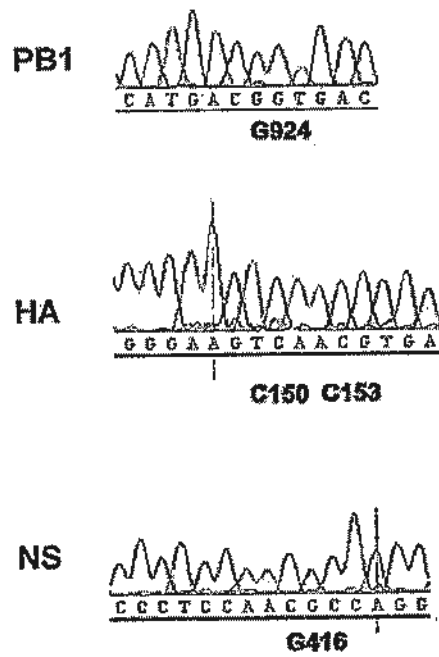


Fig. 5B



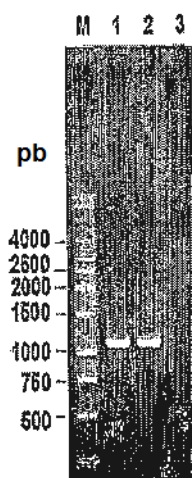


Fig. 5C

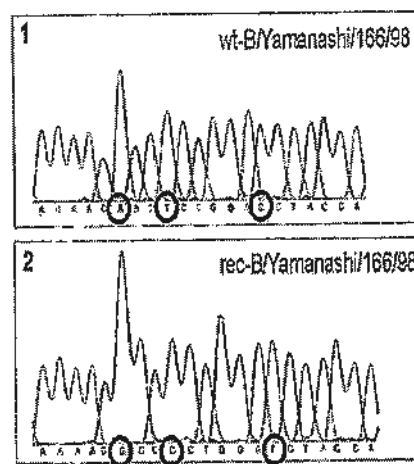


Fig. 5D

2. Secuencia en formato Genbank

LOCUS PAD3000 2836 pb ADN circular 14-ENE-2002
 DEFINICIÓN Derivado de pHW2000 con señal de poliA de SV40 para reemplazar a BGH

CARACTERÍSTICAS Location/Qualifiers

promotor 2420..2799
 /vntifkey="29"
 /label=pCMV
 /nota="promotor de CMV truncado (correspondiente a la región 484-863 de pCDNA3)"

marcador_misc 1422..2282
 /vntifkey="22"
 /label=bla
 /nota="beta lactamasa"

origen_rep 612..1172
 /vntifkey="33"
 /label=Col\E1ori
 /nota="origen de replicación de Col E1"

terminador 11..45
 /vntifkey="43"
 /label=tI

promotor /nota="terminador de Pol I"
 complement(65..276)
 /vntifkey="29"
 /label=PolI

exón /nota="Promotor de Pol I humano"
 296..430
 /vntifkey="61"
 /label=pA
 /nota="pA (SV40)"

RECuento DE BASES 717 a 734 c 703 g 682 t

ORIGEN

```

1 ctagcagtta accggagttac tggctcgacct ccgaagtttg gggggaggag acggtaccgt
61 ctccaataac ccggcgggccc aaaatgccga ctccggagcga aagatataacc tccccgggg
121 ccgggaggtc ggcgcaccga ccacgcgcgc ggcccaggcg acgcgcgcga cggacacctg
181 tccccaaaaa cgcaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggcacaacc
241 caggacacac gccgggagcag cgcggggcgc gggacgccc cccggcggtc acctcagaca
301 tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct
361 ttattttgtg aatttgtgat gctattgctt tattttgtaac cattataagc tgcaataaac
421 aaggatctgc attaatgaat cggccaaacgc ggggggagag gcggtttgog tattgggcgc
481 tcttcgcgtt cctcgctcac tgactcgctg cgcctcggtc ttccggtgog gcgagcggtc
541 tcagctcact caaaggcggc aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag
601 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggcgc gttgctggcg
661 tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg
721 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcggt
781 cgctctctct ttcgcacctt gccgcttaac ggatacctgt ccgcctttct ccttcgggga
841 agcgtggcgc tttctcaatg ctcaocctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc
901 tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggc
961 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagacttat cgcactggc agcagccact
1021 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg
1081 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
1141 accttcggaa aaagagtttg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggc
1201 ggtttttttt tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
1261 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaa actcagctta agggattttg
1321 gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt

```

Fig. 6

```

1381 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt
1441 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatctt cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc
1501 gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataccg
1561 cgagaaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc
1621 gagcgagaaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg
1681 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttggttc cattgctaca
1741 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtogtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga
1801 tcaaggcgag ttacatgata ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc ctcgggtcct
1861 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggttat ggcagcactg
1921 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca
1981 accaagtcct tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata
2041 cgggataata ccgcccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct
2101 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaacccact
2161 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa
2221 acaggaaggc aaaatgcgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc
2281 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga
2341 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttcccga
2401 aaagtgcac ctgacgtcga tatgccagt acgccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa
2461 tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac
2521 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg
2581 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg
2641 agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac ttccaaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc
2701 ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg
2761 ctaactagag aacccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctataggag
2821 acccaagctg ttaacg

```

//

Fig. 6 Cont.

**ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA CONSENSO DE VDM-B CON ADNC
EN LOS OCHOS PLÁSMIDOS (PAB12[SEGMENTO N])
(SEC ID N°: 95-102)**

PB1

	*	20	*	40	*		
pAB121-PB1	:					:	50
MDV-B-PB1	:					:	50
		AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATGAATATAAAATCCTTATTTTCTCTTCAT					
		60	*	80	*	100	
pAB121-PB1	:					:	100
MDV-B-PB1	:					:	100
		AGATGTACCCATACAGGCAGCAATTTCAACAACATTCCCATACACCGGTG					
		*	120	*	140	*	
pAB121-PB1	:					:	150
MDV-B-PB1	:					:	150
		TTCCCCCTTATTTCCCATGGAACGGGAACAGGCTACACAATAGACACCGTG					
		160	*	180	*	200	
pAB121-PB1	:					:	200
MDV-B-PB1	:					:	200
		ATTAGAACACATGAGTACTCAAACAAGGGAAAACAATACATTTCTGATGT					
		*	220	*	240	*	
pAB121-PB1	:					:	250
MDV-B-PB1	:					:	250
		TACAGGATGTGCAATGGTAGATCCAACAAATGGGCCATTACCCGAAGATA					
		260	*	280	*	300	
pAB121-PB1	:					:	300
MDV-B-PB1	:					:	300
		ATGAGCCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGCGTTCTGGAGGCTTTGGAT					
		*	320	*	340	*	
pAB121-PB1	:					:	350
MDV-B-PB1	:					:	350
		AGAATGGATGAAGAACATCCAGGTCTGTTTCAAGCAGCCTCACAGAATGC					
		360	*	380	*	400	
pAB121-PB1	:					:	400
MDV-B-PB1	:					:	400
		CATGGAGGCACTAATGGTCACAACCTGTAGACAAATTAACCCAGGGGAGAC					
		*	420	*	440	*	
pAB121-PB1	:					:	450
MDV-B-PB1	:					:	450
		AGACTTTTGATTGGACAGTGTGCAGAAACCAACCTGCTGCAACGGCACTG					
		460	*	480	*	500	
pAB121-PB1	:					:	500
MDV-B-PB1	:					:	500
		AACACAACAATAACCTCTTTTAGGTTGAATGATTGAATGGAGCCGACAA					

Fig. 7

ES 2 550 007 T3

		*	520	*	540	*	
pAB121-PB1	:						550
MDV-B-PB1	:						550
				GGGTGGATTAGTACCCTTTTGCCAAGATATCATTGATTCATTGGACAAAC			
			560	*	580	*	600
pAB121-PB1	:						600
MDV-B-PB1	:						600
				CTGAAATGACTTTCTTCTCGGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGCT			
		*	620	*	640	*	
pAB121-PB1	:						650
MDV-B-PB1	:						650
				AAAAACAGAAAGGGTTTCCTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGA			
			660	*	680	*	700
pAB121-PB1	:						700
MDV-B-PB1	:						700
				CAGAATAACCAGAGTGGAATACATCAAAAGAGCATTATCATTAAACACAA			
		*	720	*	740	*	
pAB121-PB1	:						750
MDV-B-PB1	:						750
				TGACAAAAGATGCTGAAAGAGGCCAAACTAAAAAGAAGAGCAATTGCCACC			
			760	*	780	*	800
pAB121-PB1	:						800
MDV-B-PB1	:						800
				GCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAA			
		*	820	*	840	*	
pAB121-PB1	:						850
MDV-B-PB1	:						850
				AAATATCTGTGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACG			
			860	*	880	*	900
pAB121-PB1	:						900
MDV-B-PB1	:						900
				AGAAGAAGGCCAAACTGTCAAATGCAGTGGCCAAAATGCTCAGTAACTGC			
		*	920	*	940	*	
pAB121-PB1	:						950
MDV-B-PB1	:						950
				CCACCAGGAGGGATCAGCATGACAGTGACAGGAGACAATACTAAATGGAA			
			960	*	980	*	1000
pAB121-PB1	:						1000
MDV-B-PB1	:						1000
				TGAATGCTTAAATCCAAGAATCTTTTGGCTATGACTGAAAGAATAACCA			
		*	1020	*	1040	*	
pAB121-PB1	:						1050
MDV-B-PB1	:						1050
				GAGACAGCCCAATTTGGTTCCGGGATTTTGTAGTATAGCACCGGTCTTG			
			1060	*	1080	*	1100

Fig. 7 Cont.


```

pAB121-PB1 : ..... : 1100
MDV-B-PB1 : ..... : 1100
          TTCTCCAATAAAATAGCCAGATTGGGAAAAGGGTTCATGATAACAAGCAA

          *      1120      *      1140      *
pAB121-PB1 : ..... : 1150
MDV-B-PB1 : ..... : 1150
          AACAAAAAGACTGAAGGCTCAAATACCTTGTCCTCGATCTGTTTAATATAC

          1160      *      1180      *      1200
pAB121-PB1 : ..... : 1200
MDV-B-PB1 : ..... : 1200
          CATTAGAAAGATATAATGAAGAAACAAGGGCAAAATTAAAAAAGCTGAAA

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          2160      *      2180      *      2200

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

          2360
pAB121-PB1 : ..... : 2369
MDV-B-PB1 : ..... : 2369
          AAAGGCTCGTGTCTTCTACT

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

      560          *           580          *           600

```

Fig. 7 Cont.

```

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

          *          620          *          640          *
pAB122-PB2 : ..... : 650
MDV-B-PB2 : ..... : 650
          ,AAAAATTGAAAGGAACGATGATAACTCCCATTGTACTGGCATAACATGCTT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1660          *      1680          *      1700

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          2160          *          2180          *          2200
pAB122-PB2 : ..... : 2200
MDV-B-PB2 : ..... : 2200
          GATTTCAAAAGTATTGAAGAACTTGAAAAGCTAAAACCGGGGGAAAAAGC

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

          2360      *      2380      *
pAB122-PB2 : ..... : 2396
MDV-B-PB2  : ..... : 2396
          TTAATTCAATAGACACAATTGAGTGAAAAATGCTCGTGTCTTCTACT

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

      560          *          580          *          600
pAB123-PA : ..... : 600

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1060          *          1080          *          1100
pAB123-PA : ..... : 1100
MDV-B-PA : ..... : 1100
          GGGACTGTGTAAATACAATAAGTAATGAGGAAACAAGTAACGAATTACAG

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1660      *      1680      *      1700

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

HA					
	*	20	*	40	*
MDV-B-HA	:		:	50	
pAB124-HA	:		:	50	
		AGCAGAAGCAGAGCATTCTTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGT			
	60	*	80	*	100
MDV-B-HA	:		:	100	
pAB124-HA	:		:	100	
		ACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAA			
	*	120	*	140	*
MDV-B-HA	:		:	150	
pAB124-HA	:		:	150	
		CATCGTCAAACCTACCCCATGTGGTCAAACCTGCTACTCAAGGGGAAGTC			
	160	*	180	*	200
MDV-B-HA	:	..t.....	:	200	
pAB124-HA	:		:	200	
		AACGTGACTGGTGTGATACCACTGACAACAACACCTACCAAATCTCATTT			
	*	220	*	240	*
MDV-B-HA	:		:	250	
pAB124-HA	:		:	250	
		TGCAAATCTCAAAGGAACACAGACCAGAGGGAAACTATGCCCAAACCTGTC			
	260	*	280	*	300
MDV-B-HA	:		:	300	
pAB124-HA	:		:	300	
		TCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAGTGTATGGGG			
	*	320	*	340	*
MDV-B-HA	:		:	350	
pAB124-HA	:		:	350	
		ACCATACCTTCGGCAAAAGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTAC			
	360	*	380	*	400
MDV-B-HA	:		:	400	
pAB124-HA	:		:	400	
		ATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAATCAGACAGCTAC			
	*	420	*	440	*
MDV-B-HA	:		:	450	
pAB124-HA	:		:	450	
		CCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAGCCCCGTAACGTT			
	460	*	480	*	500
MDV-B-HA	:		:	500	
pAB124-HA	:		:	500	
		ATCAACGCAGAAACGGCACCAGGAGGACCCTACATAGTTGGAACCTCAGG			
	*	520	*	540	*
MDV-B-HA	:		:	550	
pAB124-HA	:		:	550	
		ATCTTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAAGGATTCTTCGCAACAATGGCTT			
	560	*	580	*	600
MDV-B-HA	:		:	600	

Fig. 7 Cont.

```

pAB124-HA : ..... : 600
          GGGCTGTCCCAAAAAACAACAAAACCAAAACAGCAACGAACCCATTAAACA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

          1660      *      1680      *      1700

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

              1860      *      1880
MDV-B-HA : ..... : 1884
pAB124-HA : ..... : 1884
          AAAAACGTTATTGAAAAATGCTCTTGTTACTACT

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

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

Fig. 7 Cont.

```

MDV-B-NP : ..... : 600
          TACTTCAGCCCTATAAGAATTACCTTTTTTAAAAGAAGAGGTGAAAACAAT
          610      620      630      640      650
pAB125-NP : ..... : 650
MDV-B-NP : ..... : 650
          GTACAAAACCACCATGGGGAGTGATGGTTTCAGTGGACTAAATCACATCA
          660      670      680      690      700
pAB125-NP : ..... : 700
MDV-B-NP : ..... : 700
          TGATTGGGCATTACAGATGAACGATGTCTGTTTCCAAAGATCAAAGGCA
          710      720      730      740      750
pAB125-NP : ..... : 750
MDV-B-NP : ..... : 750
          CTAAAAAGAGTTGGACTTGACCCTTCATTAATCAGTACTTTTGCAGGAAG
          760      770      780      790      800
pAB125-NP : ..... : 800
MDV-B-NP : ..... : 800
          CACACTCCCCAGAAGATCAGGTGCAACTGGTGTGCGATCAAAGGAGGTG
          810      820      830      840      850
pAB125-NP : ..... : 850
MDV-B-NP : ..... : 850
          GAACTTTAGTGGCAGAAGCCATTTCGATTTATAGGAAGAGCAATGGCAGAC
          860      870      880      890      900
pAB125-NP : ..... : 900
MDV-B-NP : ..... : 900
          AGAGGGCTATTGAGAGACATCAGAGCCAAGACGGCCTATGAAAAGATTCT
          910      920      930      940      950
pAB125-NP : ..... : 950
MDV-B-NP : ..... : 950
          TCTGAATCTGAAAAACAAGTGCTCTGCGCCCCAACAAAAGGCTCTAGTTG
          960      970      980      990      1000
pAB125-NP : ..... : 1000
MDV-B-NP : ..... : 1000
          ATCAAGTGATCGGAAGTAGAAATCCAGGGATTGCAGACATAGAAGACCTA
          1010      1020      1030      1040      1050
pAB125-NP : ..... : 1050
MDV-B-NP : ..... : 1050
          ACCCTGCTTGCCCGAAGCATGGTCGTTGTCAGGCCCTCTGTAGCGAGCAA
          1060      1070      1080      1090      1100
pAB125-NP : ..... : 1100
MDV-B-NP : ..... : 1100
          AGTGGTGCTTCCCATAAGCATTTATGCCAAAATACCTCAACTAGGGTTCA

```

Fig 7. Cont.

	1110	1120	1130	1140	1150	
pAB125-NP	:		:			: 1150
MDV-B-NP	:		:			: 1150
	ATGTTGAAGAATACTCTATGGTTGGGTATGAAGCCATGGCTCTTTATAAT					
	1160	1170	1180	1190	1200	
pAB125-NP	:		:			: 1200
MDV-B-NP	:		:			: 1200
	ATGGCAACACCTGTTTCCATATTAAGAATGGGAGACGATGCAAAAGATAA					
	1210	1220	1230	1240	1250	
pAB125-NP	:		:			: 1250
MDV-B-NP	:		:			: 1250
	ATCACAATTATTCTTCATGTCTTGCTTCGGAGCTGCCTATGAAGACCTAA					
	1260	1270	1280	1290	1300	
pAB125-NP	:		:			: 1300
MDV-B-NP	:		:			: 1300
	GAGTTTGTCTGCACTAACAGGCACAGAATTCAAGCATAGGTCAGCATTAA					
	1310	1320	1330	1340	1350	
pAB125-NP	:		:			: 1350
MDV-B-NP	:		:			: 1350
	AAGTGCAAGGGTTTCCACGTTCCAGCAAAGGAGCAAGTGGAAAGGAATGGG					
	1360	1370	1380	1390	1400	
pAB125-NP	:		:			: 1400
MDV-B-NP	:		:			: 1400
	GGCAGCTCTGATGTCCATCAAGCTCCAGTTTTGGGCTCCAATGACCAGAT					
	1410	1420	1430	1440	1450	
pAB125-NP	:		:			: 1450
MDV-B-NP	:		:			: 1450
	CTGGGGGGAATGAAGTAGGTGGAGACGGAGGGTCTGGTCAAATAAGTTGC					
	1460	1470	1480	1490	1500	
pAB125-NP	:		:			: 1500
MDV-B-NP	:		:			: 1500
	AGCCCCGTGTTTGCAGTAGAAAGACCTATTGCTCTAAGCAAGCAAGCTGT					
	1510	1520	1530	1540	1550	
pAB125-NP	:		:			: 1550
MDV-B-NP	:		:			: 1550
	AAGAAGAATGCTGTCAATGAATATTGAGGGACGTGATGCAGATGTCAAAG					
	1560	1570	1580	1590	1600	
pAB125-NP	:		:			: 1600
MDV-B-NP	:		:			: 1600
	GAAATCTACTCAAGATGATGAATGATTCAATGACTAAGAAAACCAATGGA					
	1610	1620	1630	1640	1650	
pAB125-NP	:		:			: 1650
MDV-B-NP	:		:			: 1650
	AATGCTTTCATTGGGAAGAAAATGTTTCAAATATCAGACAAAAACAAAAC					
	1660	1670	1680	1690	1700	
pAB125-NP	:		:			: 1700

Fig 7. Cont.

ES 2 550 007 T3

```

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

NA

		*	20	*	40	*	
pAB126-NA	:						: 50
MDV-B-NA	:						: 50
		AGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCAAAACTGAAGCAAATAGGCCAAAAATGA					
		60	*	80	*	100	
pAB126-NA	:						: 100
MDV-B-NA	:						: 100
		ACAATGCTACCTTCAACTATACAAACGTTAACCCCTATTTCTCACATCAGG					
		*	120	*	140	*	
pAB126-NA	:						: 150
MDV-B-NA	:						: 150
		GGGAGTGTTATTATCACTATATGTGTCAGCTTCACTGTCATACTTATTGT					
		160	*	180	*	200	
pAB126-NA	:						: 200
MDV-B-NA	:						: 200
		ATTCGGATATATTGCTAAAATTTTCACCAACAAAAATAACTGCACCAACA					
		*	220	*	240	*	
pAB126-NA	:						: 250
MDV-B-NA	:						: 250
		ATGTCATTGGATTGCGCGAACGTATCAAATGTTCAAGGCTGTGAACCGTTC					
		260	*	280	*	300	
pAB126-NA	:						: 300
MDV-B-NA	:						: 300
		TGCAACAAAAGAGATGACATTTCTTCTCCCAGAGCCGGAGTGGACATACC					
		*	320	*	340	*	
pAB126-NA	:						: 350
MDV-B-NA	:						: 350
		CTCGTTTATCTTGCCAGGGCTCAACCTTTCAGAAAGCACTCCTAATTAGC					
		360	*	380	*	400	
pAB126-NA	:						: 400
MDV-B-NA	:						: 400
		CCTCATAGGTTCCGAGAAACCAGAGGAAACTCAGCTCCCTTGATAATAAG					
		*	420	*	440	*	
pAB126-NA	:						: 450
MDV-B-NA	:						: 450
		GGAACCCTTTGTGCTTGTGGACCAAAGGAATGCAGACACTTTGCTCTAA					
		460	*	480	*	500	
pAB126-NA	:						: 500
MDV-B-NA	:						: 500
		CCCATTATGCAGCTCAACCAGGGGGATACTACAATGGAACAAGAAAGGAC					
		*	520	*	540	*	
pAB126-NA	:						: 550
MDV-B-NA	:						: 550
		AGAAACAAGCTGAGGCATCTGATTTCAAGTCAAATTAGGCAAATCCCAAC					
		560	*	580	*	600	

Fig. 7 Cont.

```

pAB126-NA : ..... : 600
MDV-B-NA   : ..... : 600
          TG TAGAAA ACTCCATTTTCCACATGGCAGCTTGGAGTGGGTCCGCATGCC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig 7. Cont.

ES 2 550 007 T3

M	*	20	*	40	*
pAB127-M :					50
MDV-B-M :					50
		AGCAGAAGCAGCACCTTCTTAAATGTCGCTGTTGGAGACACAATTGC			
	60	*	80	*	100
pAB127-M :					100
MDV-B-M :					100
		CTACCTGCTTTCACTAACAGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAG			
	*	120	*	140	*
pAB127-M :					150
MDV-B-M :					150
		AAAAATTACACTGTTGGTTCGGTGGGAAAGAATTGACCTAGACTCTGCT			
	160	*	180	*	200
pAB127-M :					200
MDV-B-M :					200
		TTGGAATGGATAAAAAACAAAAGATGCCTAACTGATATACAAAAGCACT			
	*	220	*	240	*
pAB127-M :					250
MDV-B-M :					250
		AATTGCTGCCTCTATCTGCTTTTTTAAACCCAAAGACCAAGAAAGAAAA			
	260	*	280	*	300
pAB127-M :					300
MDV-B-M :					300
		GAAGATTCATCACAGAGCCCCTGTCAGGAATGGGAACAACAGCAACAAAA			
	*	320	*	340	*
pAB127-M :					350
MDV-B-M :					350
		AAGAAAGGCCTGATTCTAGCTGAGAGAAAAATGAGAAGATGTGTGAGTTT			
	360	*	380	*	400
pAB127-M :					400
MDV-B-M :					400
		TCATGAAGCATTGAAATAGCAGAAGGCCATGAAAGCTCAGCACTACTAT			
	*	420	*	440	*
pAB127-M :					450
MDV-B-M :					450
		ATTGTCTCATGGTCATGTACCTGAACCCTGGAAATTATTCAATGCAAGTA			
	460	*	480	*	500
pAB127-M :					500
MDV-B-M :					500
		AAACTAGGAACGCTCTGTGCTTTATGCGAGAAACAAGCATCACATTCACA			
	*	520	*	540	*
pAB127-M :					550
MDV-B-M :					550
		AAGAGCTCATAGCAGAGCAGCAAGATCTTCAGTGCCTGGAGTGAGGCGAG			
	560	*	580	*	600
pAB127-M :					600

Fig. 7 Cont.

```

MDV-B-M : ..... : 600
          AAATGCAGATGGTTTCAGCTGTGAACACAGCAAAAACAATGAATGGAATG

          *          620          *          640          *
pAB127-M : ..... : 650
MDV-B-M : ..... : 650
          GGGGAAGGGAGAAGACGTCCAAAAACTGGCAGAAGAGCTGCAAAGCAACAT

          660          *          680          *          700
pAB127-M : ..... : 700
MDV-B-M : ..... : 700
          TGGAGTATTGAGATCTCTGGGGGCAAGTCAAAAGAATGGAGAAGGAATTG

          *          720          *          740          *
pAB127-M : ..... : 750
MDV-B-M : ..... : 750
          CAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAAATTCAGCT

          760          *          780          *          800
pAB127-M : ..... : 800
MDV-B-M : ..... : 800
          CTTGTGAAGAAATACCTATAATGCTCGAACCATTTCAGATTCTTTCAATT

          *          820          *          840          *
pAB127-M : ..... : 850
MDV-B-M : ..... : 850
          TGTTCCTTTCAATTTTATCAGCTCTCCATTTTCATGGCTTGGACAATAGGGCA

          860          *          880          *          900
pAB127-M : ..... : 900
MDV-B-M : ..... : 900
          TTTGAATCAAATAAAAAGAGGAGTAAACCTGAAAATACGAATAAGAAATC

          *          920          *          940          *
pAB127-M : ..... : 950
MDV-B-M : ..... : 950
          CAAATAAAGAGACAATAAACAGAGAGGTATCAATTTTGAGACACAGTTAC

          960          *          980          *          1000
pAB127-M : ..... : 1000
MDV-B-M : ..... : 1000
          CAAAAAGAAATCCAAGCCAAAGAAACAATGAAGGAAGTACTCTCTGACAA

          *          1020          *          1040          *
pAB127-M : ..... : 1050
MDV-B-M : ..... : 1050
          CATGGAGATATTGAGTGACCACATAGTAATTGAGGGGCTTTCTGCTGAAG

          1060          *          1080          *          1100
pAB127-M : ..... : 1100
MDV-B-M : ..... : 1100
          AGATAATAAAAATGGGTGAAACAGTTTTTGGAGGTAGAAGAATTGCAGTAA

```

Fig. 7 Cont.

```

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

          1160          *      1180          *
pAB127-M : ..... : 1190
MDV-B-M  : ..... : 1190
          ATGTCAGCAAATAAACTGGAAAAAGTGC GTTGTTTCTACT

```

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

NS						
	10	20	30	40	50	
pAB128-NS :						: 50
MDV-B-NS :						: 50
	AGCAGAAGCAGAGGATTTGTTTAGTCACTGGCAAACGGAAAAAATGGCG					
	60	70	80	90	100	
pAB128-NS :						: 100
MDV-B-NS :						: 100
	GACAACATGACCACAACACAAATTGAGGTAGGTCCGGGAGCAACCAATGC					
	110	120	130	140	150	
pAB128-NS :						: 150
MDV-B-NS :						: 150
	CACCATAAACTTTGAAGCAGGAATTCTGGAGTGCTATGAAAGGCTTTCAT					
	160	170	180	190	200	
pAB128-NS :						: 200
MDV-B-NS :						: 200
	GGCAAAGAGCCCTTGACTACCCCTGGTCAAGACCGCCTAAACAGACTAAAG					
	210	220	230	240	250	
pAB128-NS :						: 250
MDV-B-NS :						: 250
	AGAAAATTAGAATCAAGAATAAAGACTCACAACAAAAGTGAGCCTGAAAG					
	260	270	280	290	300	
pAB128-NS :						: 300
MDV-B-NS :						: 300
	TAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAGCAATTGGGGTAAAAATGATGA					
	310	320	330	340	350	
pAB128-NS :						: 350
MDV-B-NS :						: 350
	AAGTGCTCCTATTTATGAATCCATCTGCTGGAATTGAAGGGTTTGAGCCA					
	360	370	380	390	400	
pAB128-NS :						: 400
MDV-B-NS :						: 400
	TACTGTATGAAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAACTGCAATTGGAC					
	410	420	430	440	450	
pAB128-NS :	G.....					: 450
MDV-B-NS :						: 450
	CGATTACCCTCCAACACCAGGAAAGTGCCTTGATGACATAGAAGAAGAAC					
	460	470	480	490	500	
pAB128-NS :						: 500
MDV-B-NS :						: 500
	CGGAGAATGTTGATGACCCAAGTAAATAGTATTGAGGGACATGAACAAC					
	510	520	530	540	550	
pAB128-NS :						: 550
MDV-B-NS :						: 550
	AAAGATGCAAGGCAAAAGATAAAGGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGG					
	560	570	580	590	600	
pAB128-NS :						: 600

Fig. 7 Cont.

ES 2 550 007 T3

```

MDV-B-NS : ..... : 600
          GAAGTTCCGTTTGACAATAAAAAAGGGATATACGTAATGTGTTGTCCTTGA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 7 Cont.

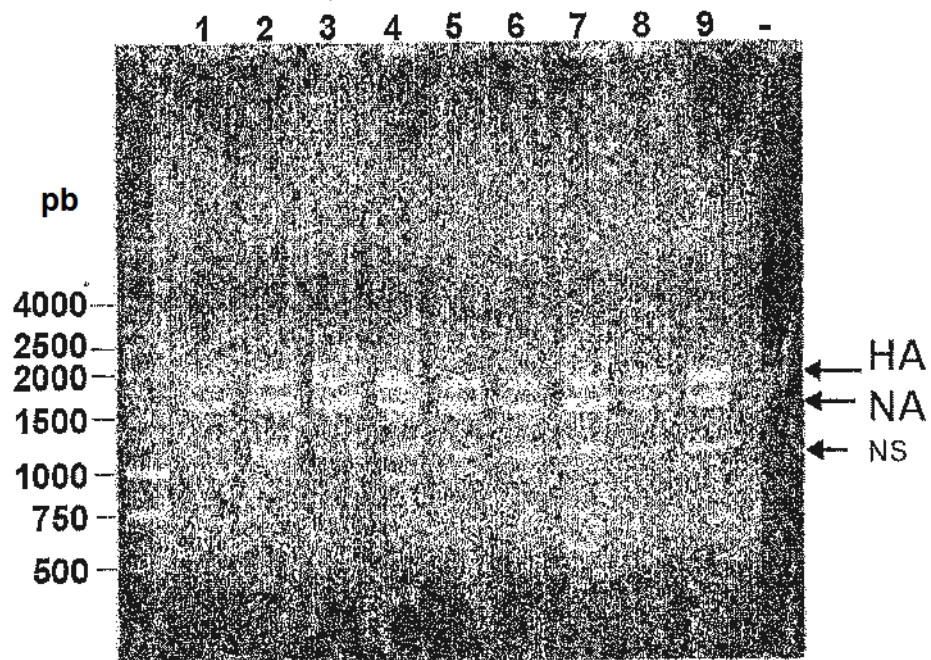


Fig. 8

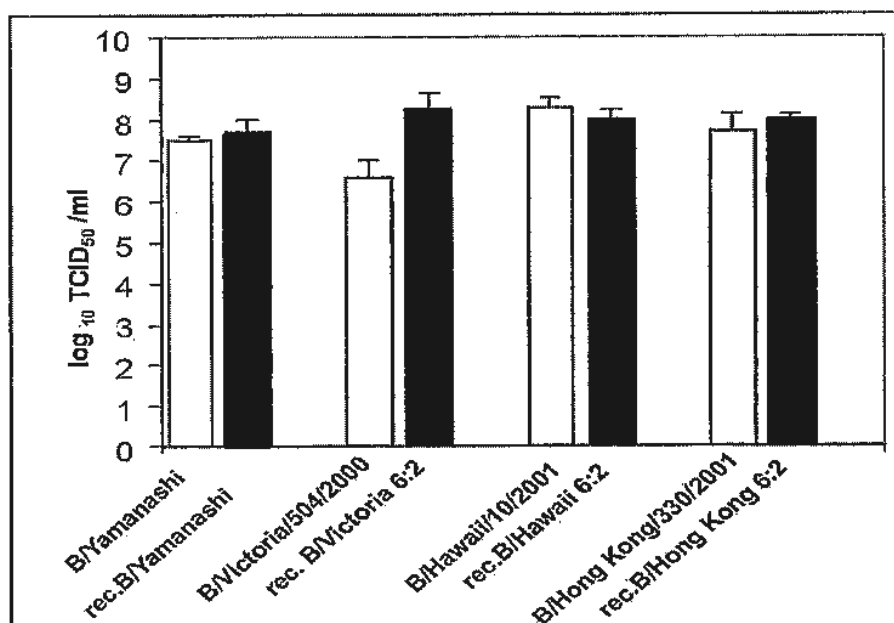


Fig. 9

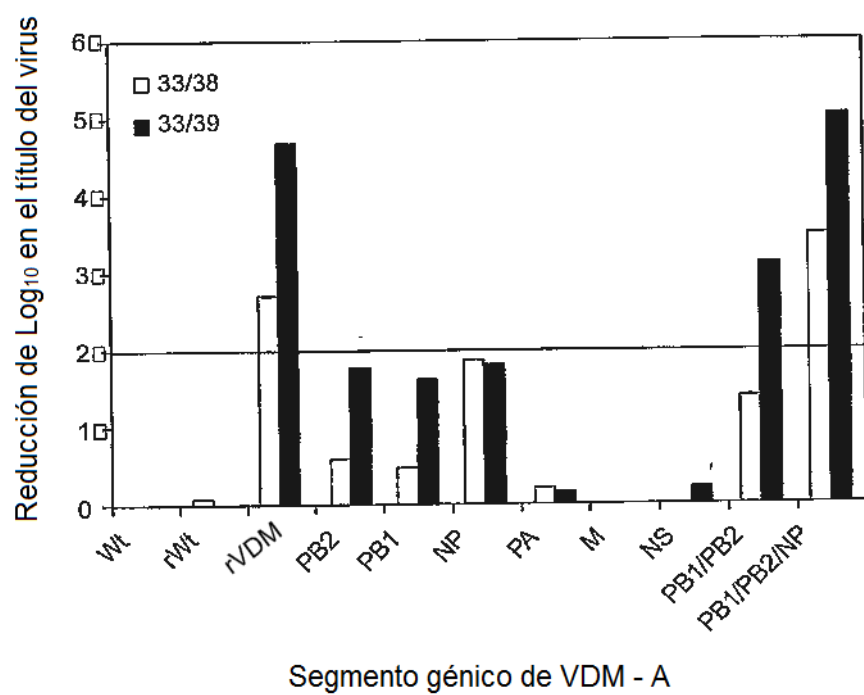


Fig. 10

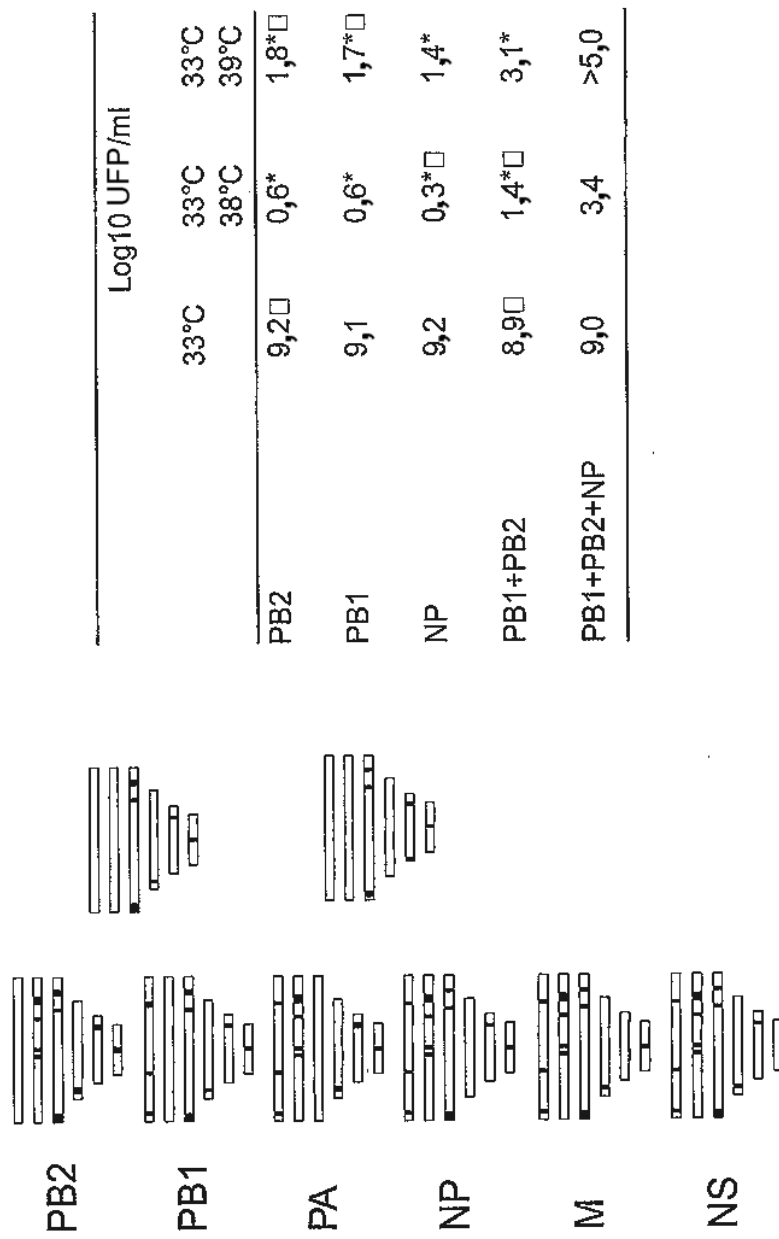


Fig. 11

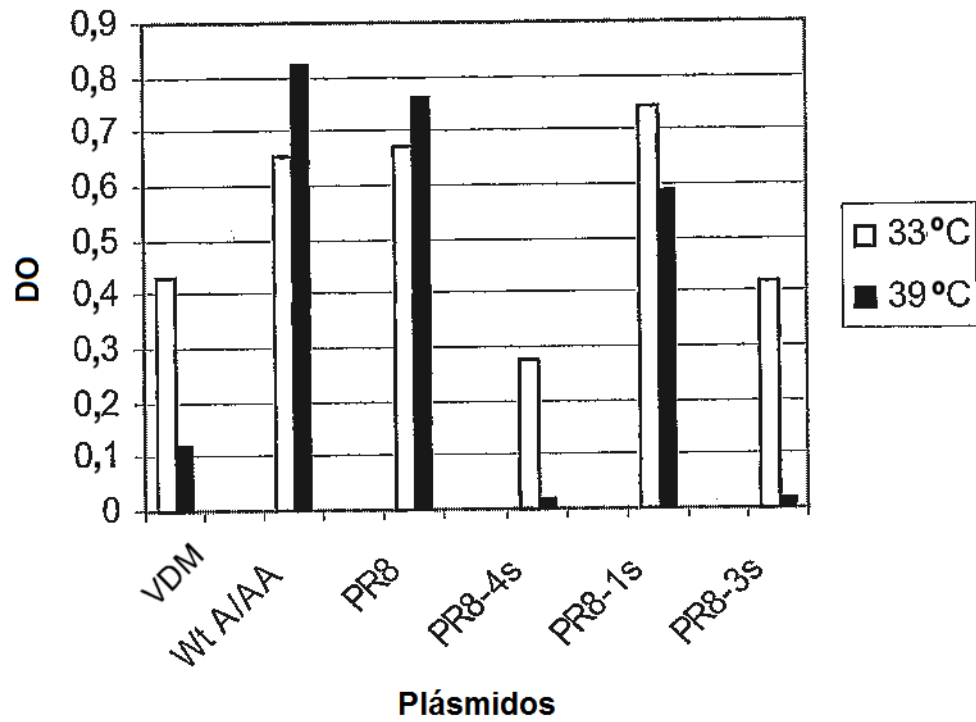


Fig. 12A

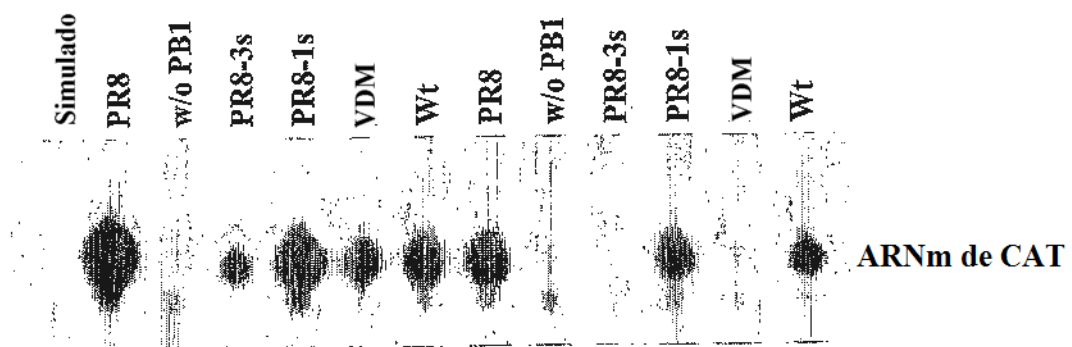


Fig. 12B

PA		NP		M1		MDCK log ufp/ml	PCK log TCID ₅₀ /ml
431	497	55	114	410	509		
M H		A A	H T	Q V		33°C 37°C Δlog	33°C 37°C Δlog
V Y		T V	P A	H M		6,6 <2 >3	5,6 3,0 2,6
V Y		A V	P A	H M		7,6 6,6 1,0	8,1 7,4 0,7
V Y		A V	P A	H M		7,6 7,1 0,5	7,4 6,5 0,95
V Y		A V	P A	H M		8,1 7,1 1,0	7,7 6,5 1,20
M H		A A	H T	Q V		7,1 3,1 4,0	7,1 3,5 3,6
V Y		T V	P A	H M		8,1 7,1 1,0	8,7 7,8 0,9
V Y		A V	P A	H M		8,1 7,2 0,9	8,5 7,8 0,7

Fig. 13

PA			NP			M1			MDCK log ufp/ml	PCK log TCID ₅₀ /ml
431	497		55	114	410	509	159	183		
M H			A A	H T			H M		33°C 37°C Δlog	33°C 37°C Δlog
M H			A V	P A			Q V		7,1 3,2 3,9	6,2 3,3 2,9
V Y			A A	H T			Q V		n.d.	5,8 2,9 2,9
V Y			A A	H T			Q V		6,2 3,2 3,0	6,1 2,7 3,4
V Y			A A	H T			H M		7,4 4,4 3,0	7,5 3,4 4,1
V Y			A A	H T			H M		7,6 4,2 3,4	8,3 4,3 4,0
M H			A V	P A			H M		7,4 4,4 3,0	8,1 4,3 3,8
M H			T V	P A			H M		8,0 6,0 2,0	8,4 4,3 4,1
V Y			T V	P A			Q V		5,6 6,0 -0,4	6,4 4,5 1,9
V Y			T V	P A			Q V		6,6 5,8 0,8	6,8 4,8 2,0

Fig. 14

PA				NP				M1				MDCK log ufp/ml	PCK log TCID ₅₀ /ml
431	497	56	114	410	509	159	183						
V Y		A V	P T			Q V		no-ts				33°C 37°C Δlog	33°C 37°C Δlog
V Y		A A	P T			Q V		no-ts				6,2 5,2 1,0	6,8 5,5 1,4
V Y		A A	P T			Q V		no-ts				6,8 6,4 0,4	7,2 6,1 1,1
V Y		T A	H T			Q V		ts				6,4 6,2 0,2	7,1 5,7 1,4
V Y		A A	P T			H M		no-ts				6,6 4,4 2,2	6,6 3,4 3,2
V Y		T A	P T			H M		no-ts				7,4 6,8 0,6	8,3 7,0 1,3
V Y								no-ts				n.d.	8,0 7,2 0,8

Fig. 15

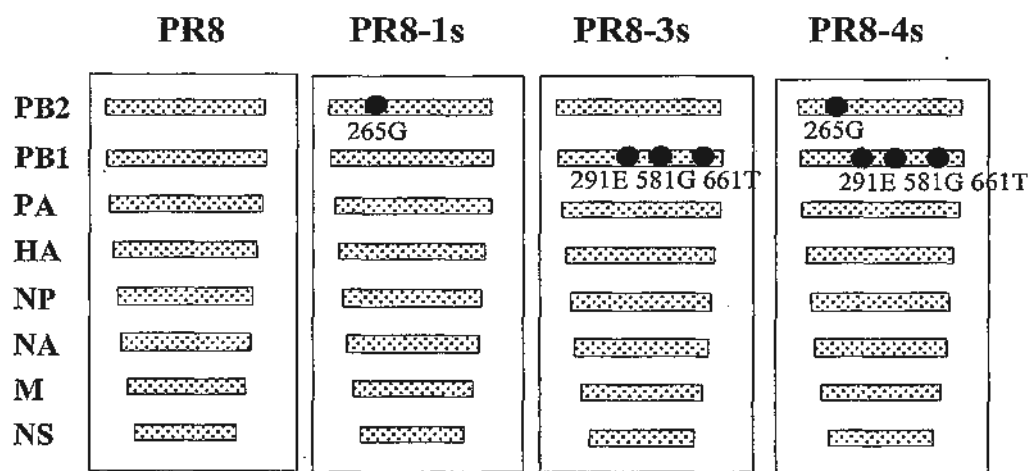


Fig. 16

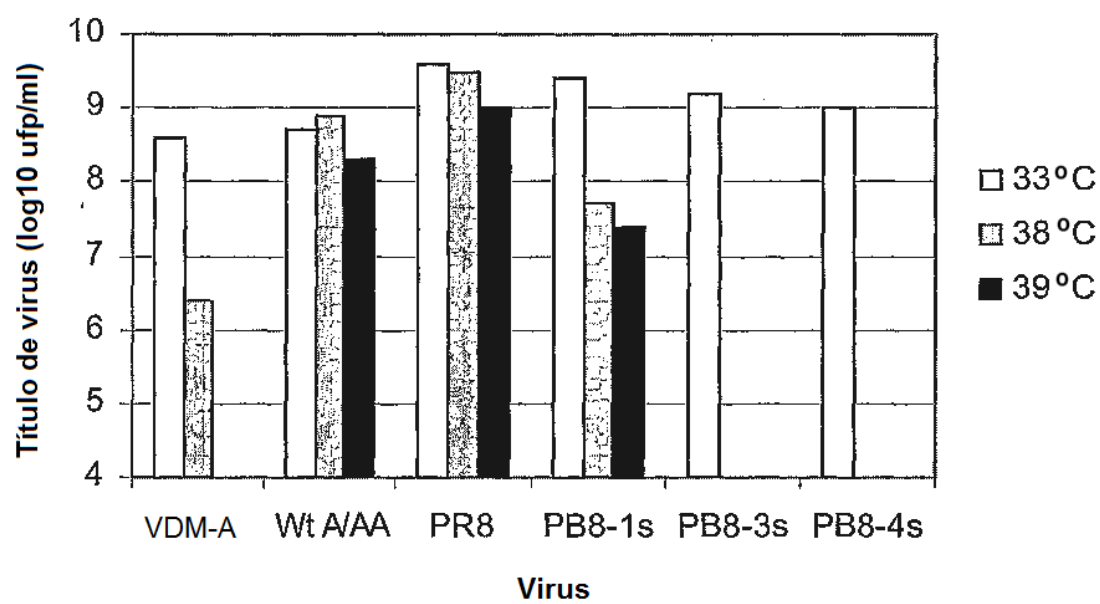


Fig. 17

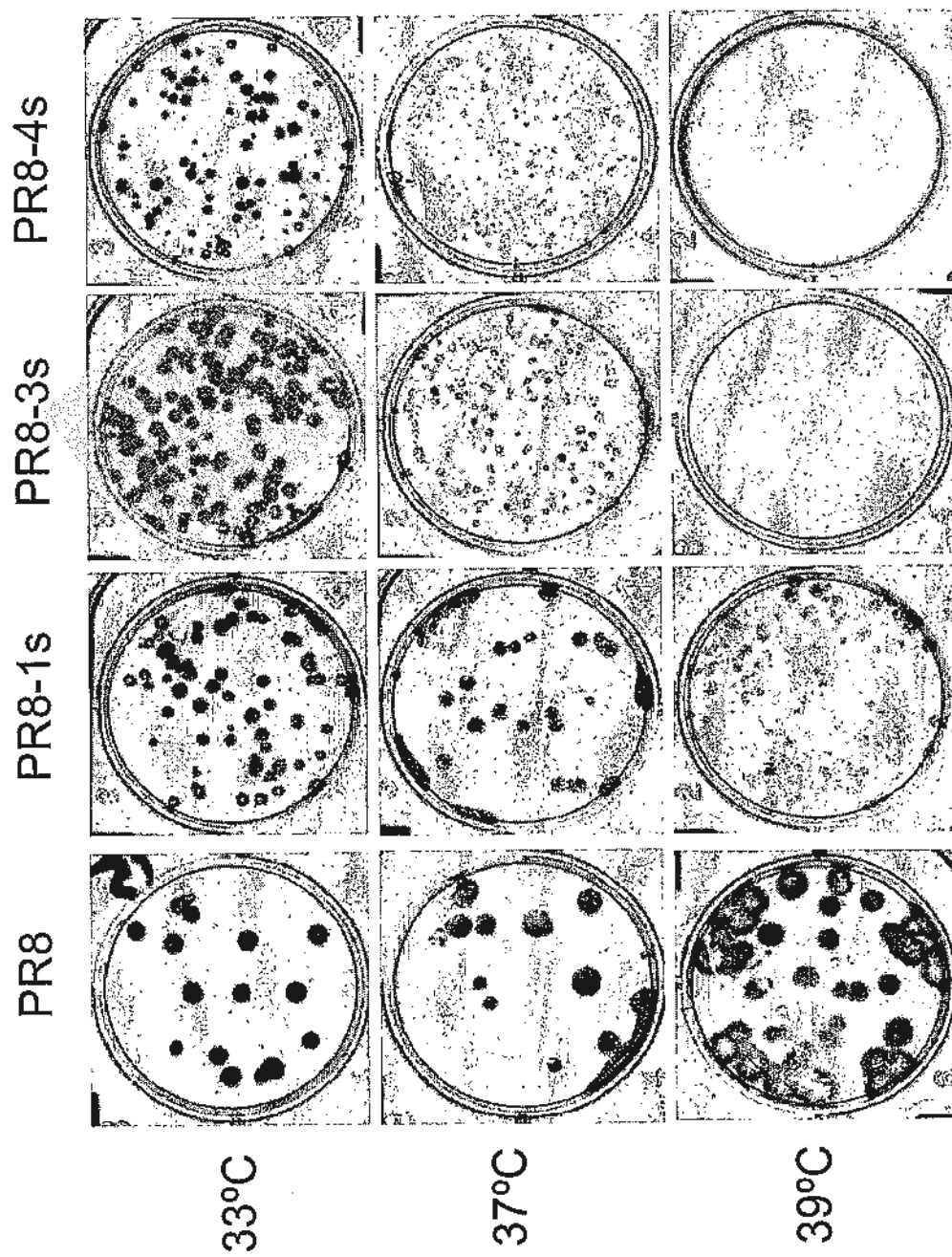


Fig. 18

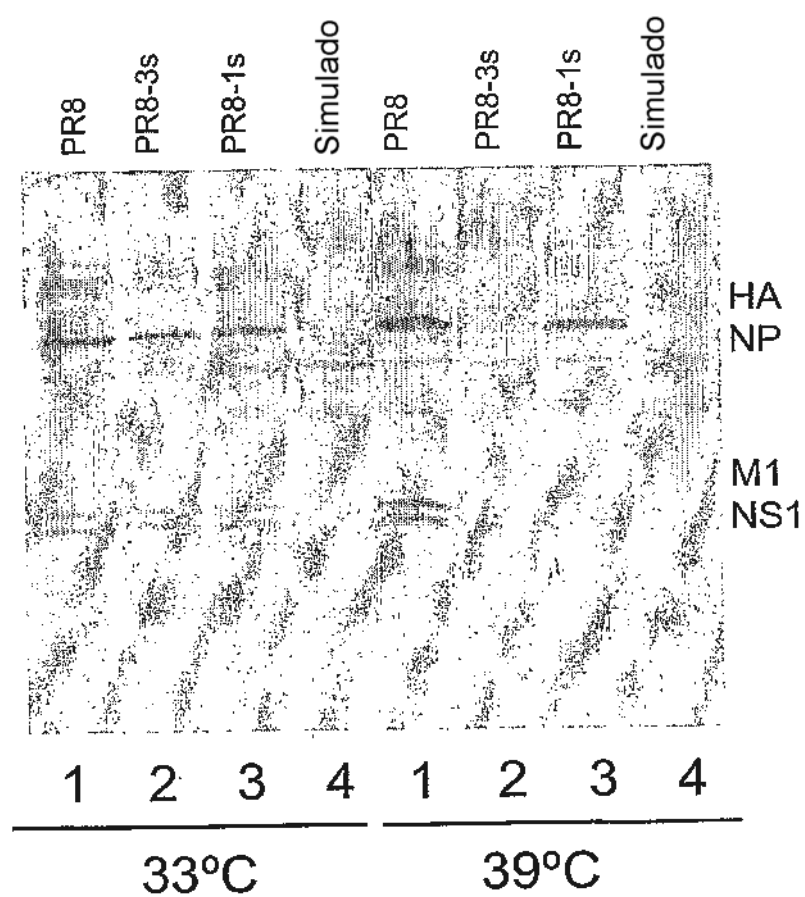


Fig. 19

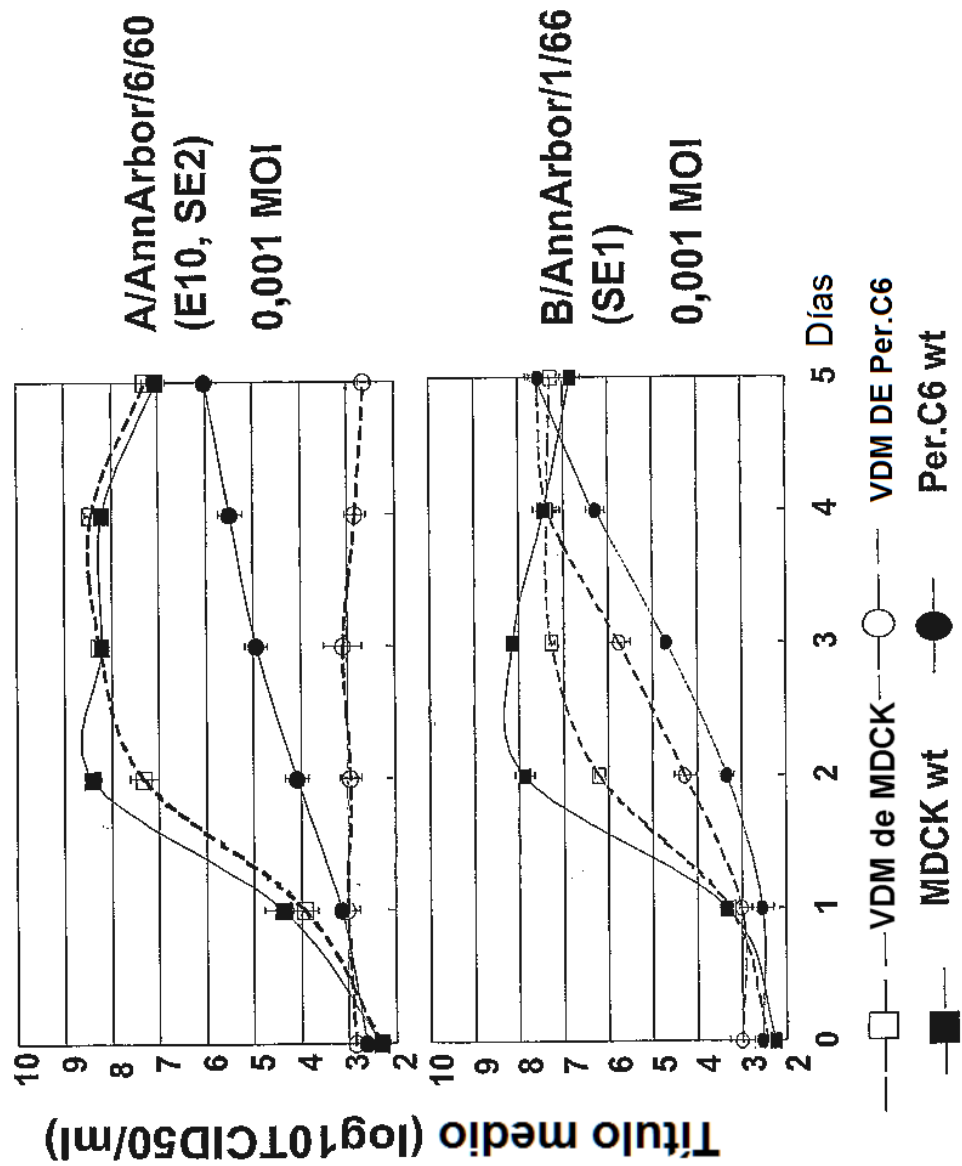


Fig. 20A

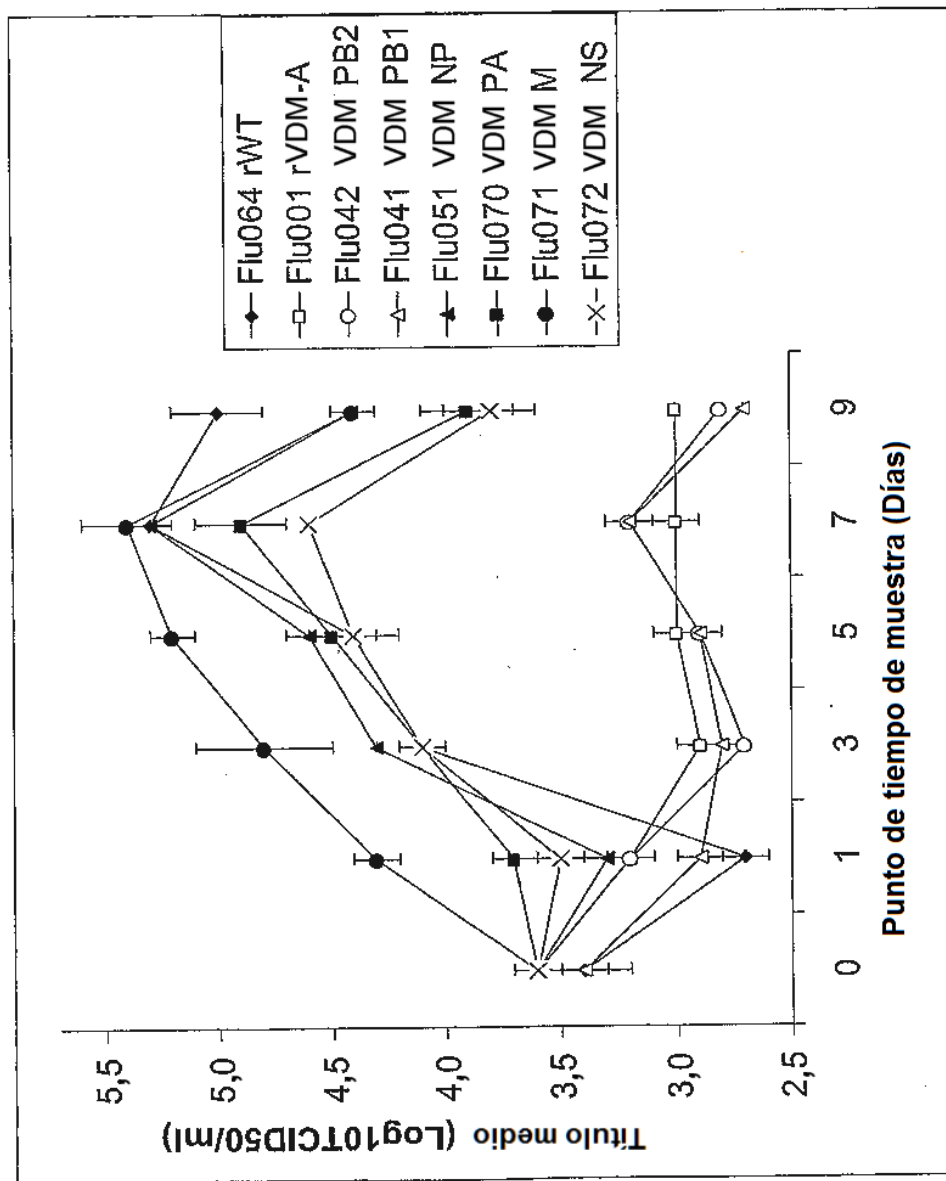


Fig. 20B

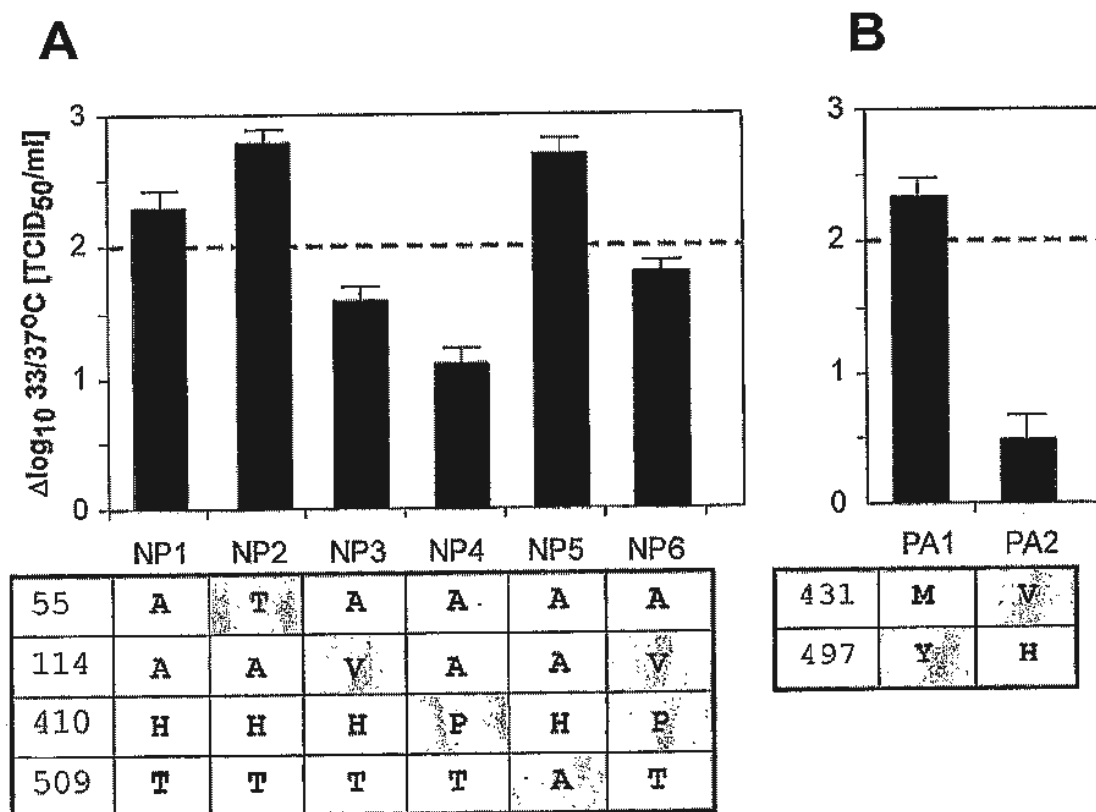
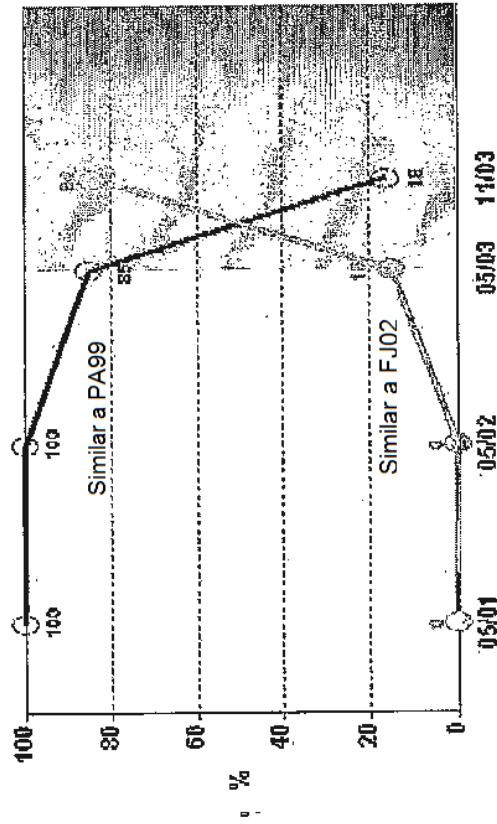


Fig. 21

Las cepas de H3N2 derivadas antigénicamente causaron una epidemia de gripe en la temporada 2003-2004



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

La temporada de grupo comenzó de manera inusualmente temprana, a partir de octubre de 2003

Mortalidad: 10,3% P e I en los EE.UU.

144 muertes asociadas a la gripe en personas de 18 años y más jóvenes

Predominantemente gripe A (99,4%), principalmente cepas de H3N2

La vacuna contra gripe no fue efectiva (MMWR 16 de enero de 2004)

Fig. 22

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

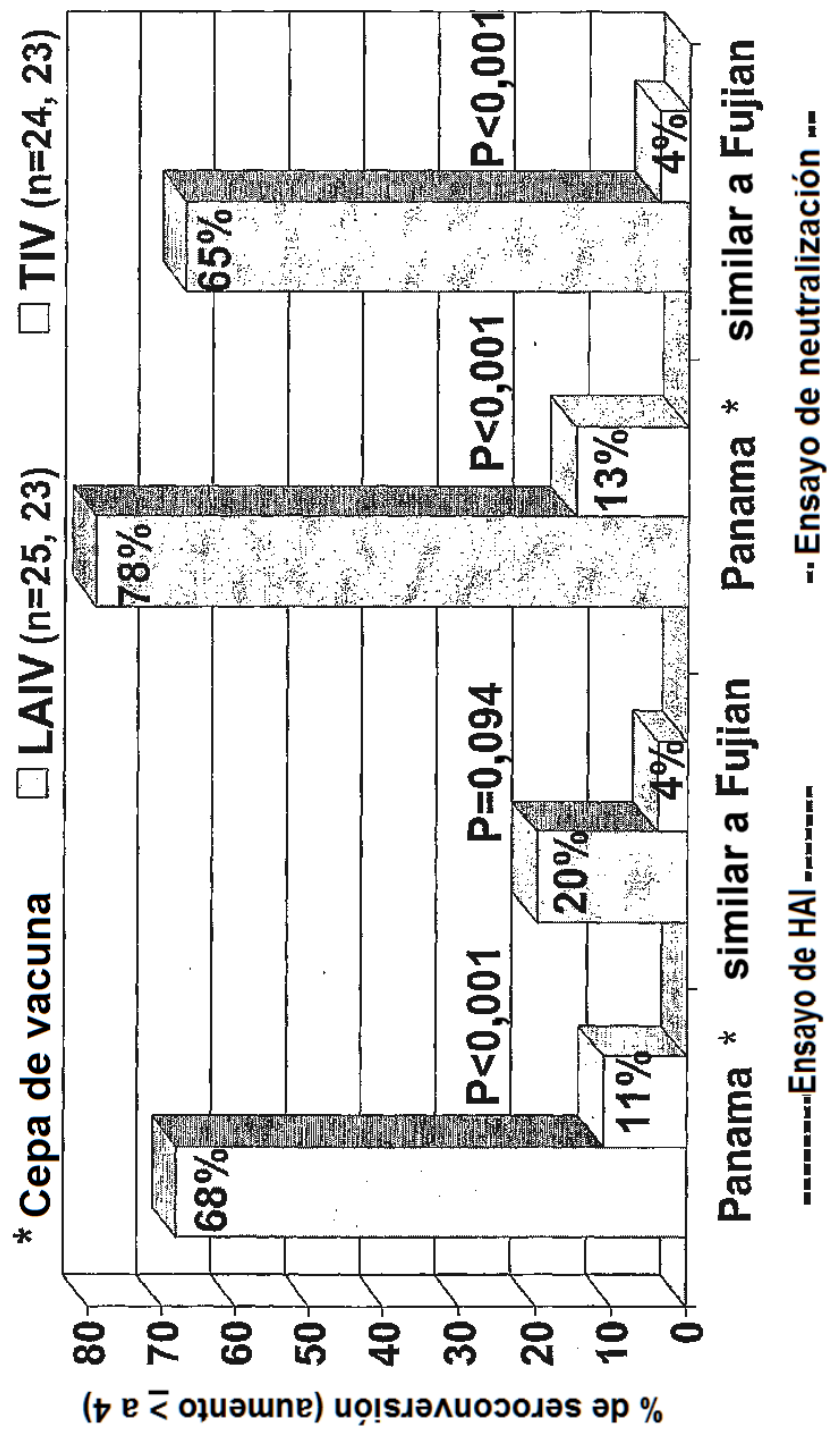


Fig. 23

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



Fig. 24

Generación de vacunas de gripe vivas atenuadas adaptadas al frío mediante plásmidos

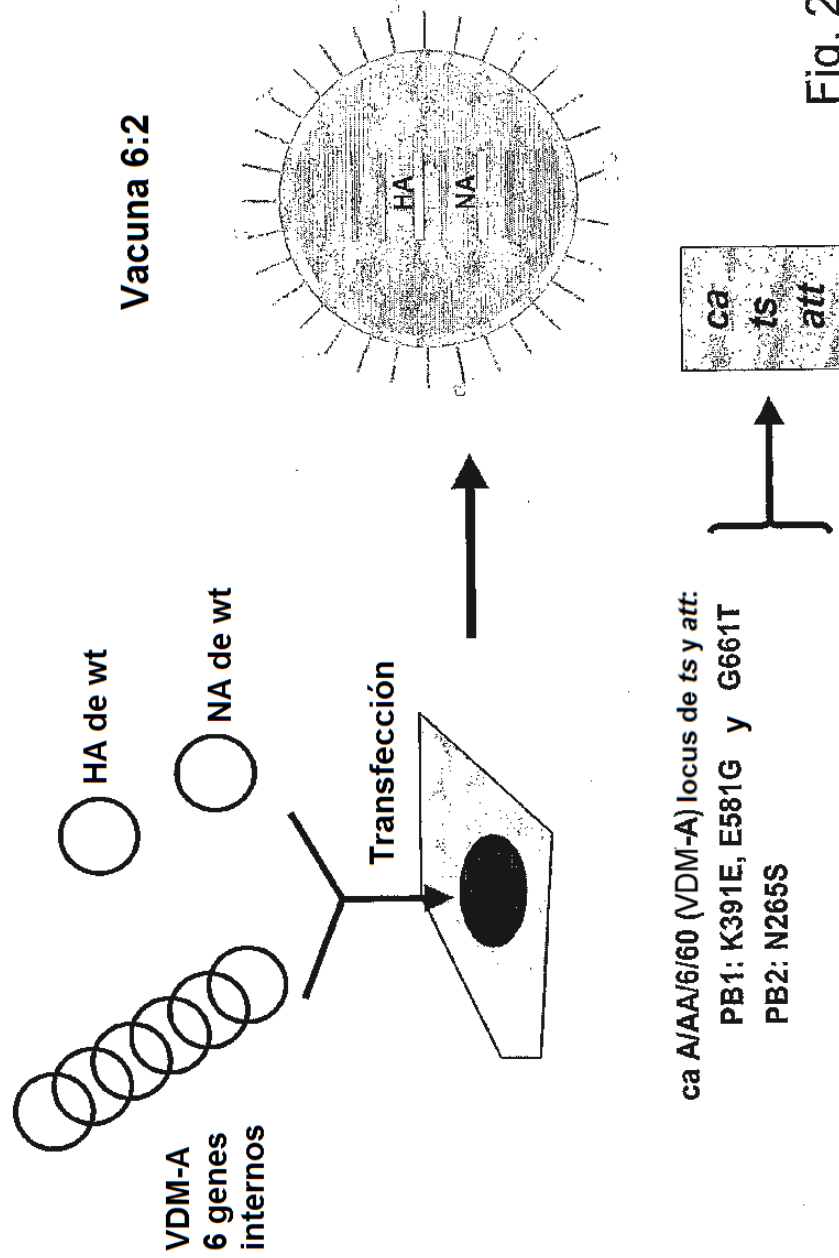


Fig. 25

Base molecular de la deriva antigénica de virus similares a A/Fujian/02 epidérmicos

Sitio de Ag	C E E A B B B D D													Crecimiento en huevo		
	21	25	50	75	83	128	131	155,6	183	186	202	219	222,5,6			
A/Panama/99	S	L	R	H	E	T	A	H	Q	L	S	V	S	WGV	Sí	
A/Wyoming/03	P	I	G	Q	K	A	T	H	H	V	I	Y	RDI		Sí	
• Flu274			G	Q	K										Sí	
• Flu275							T						RDI		Sí	
• Flu276							T	T	H				RDI		Sí	
• Flu277							T								Sí	
• Flu278													RDI		Sí	
• Flu279										H	V				No	Sí (HA-V182F)
• Flu280							T	H							No	Sí (HA-P185L)

Fig. 26

Inmunogenicidad de mutantes modificados antigénicamente

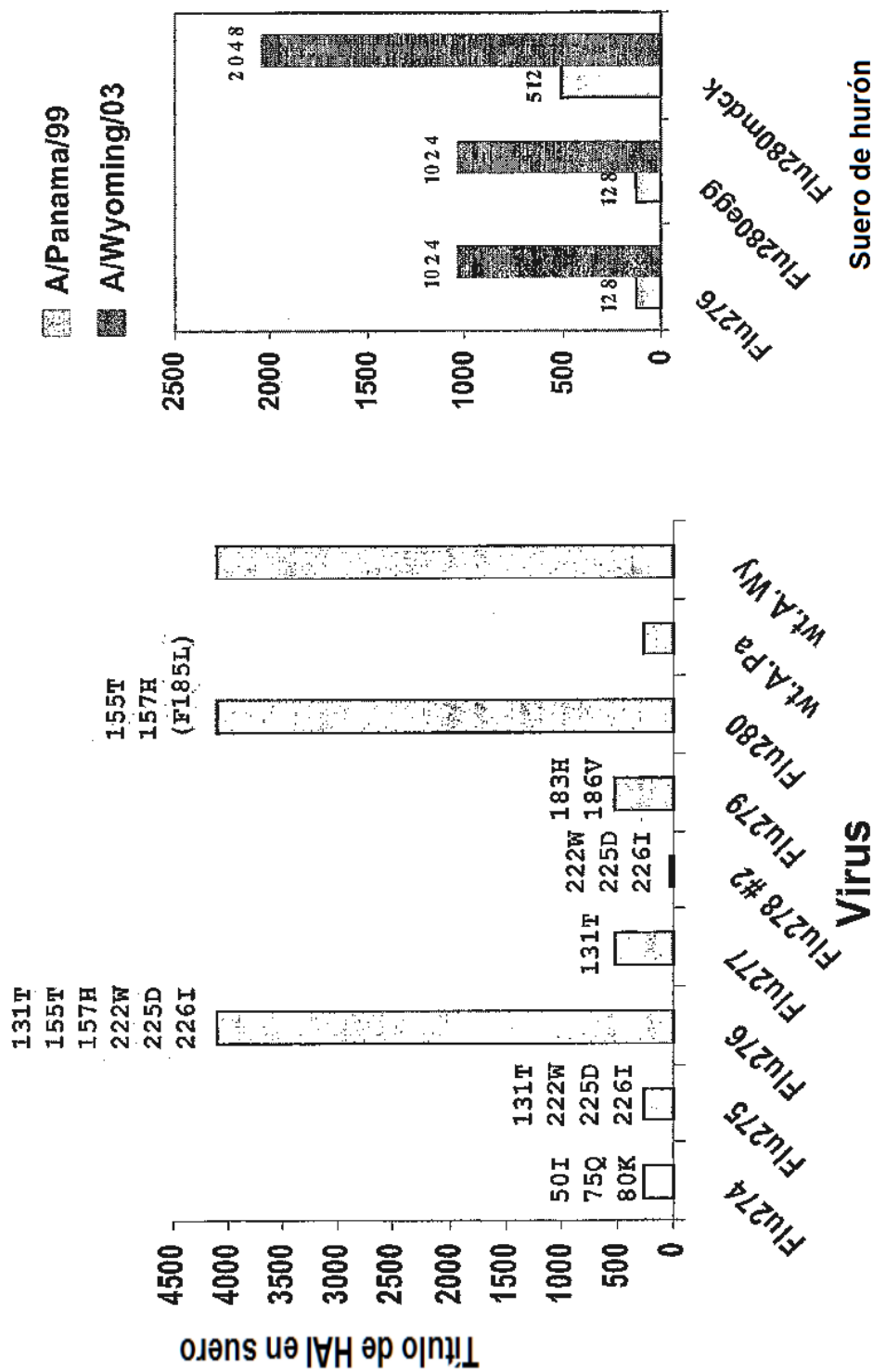


Fig. 27

Cambio genético mínimo para deriva antigénica de las cepas epidérmicas de H3N2

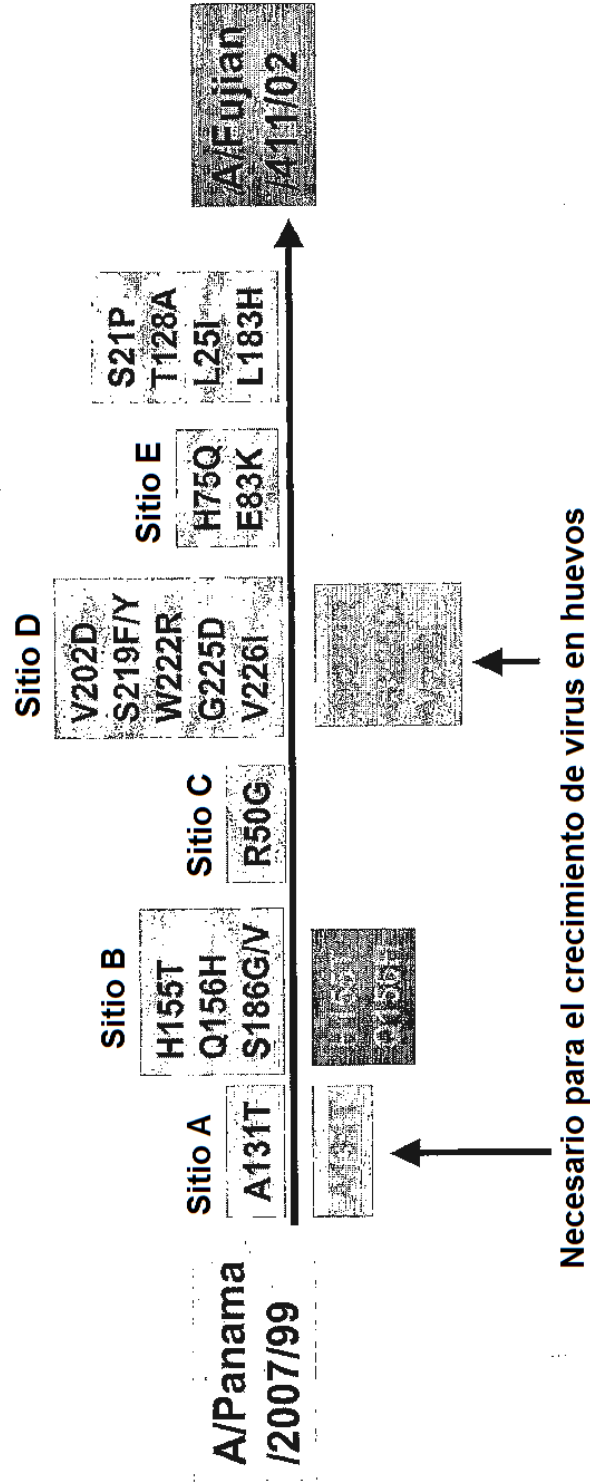


Fig. 28

Características de cepas similares a A/Fujian/411/2002

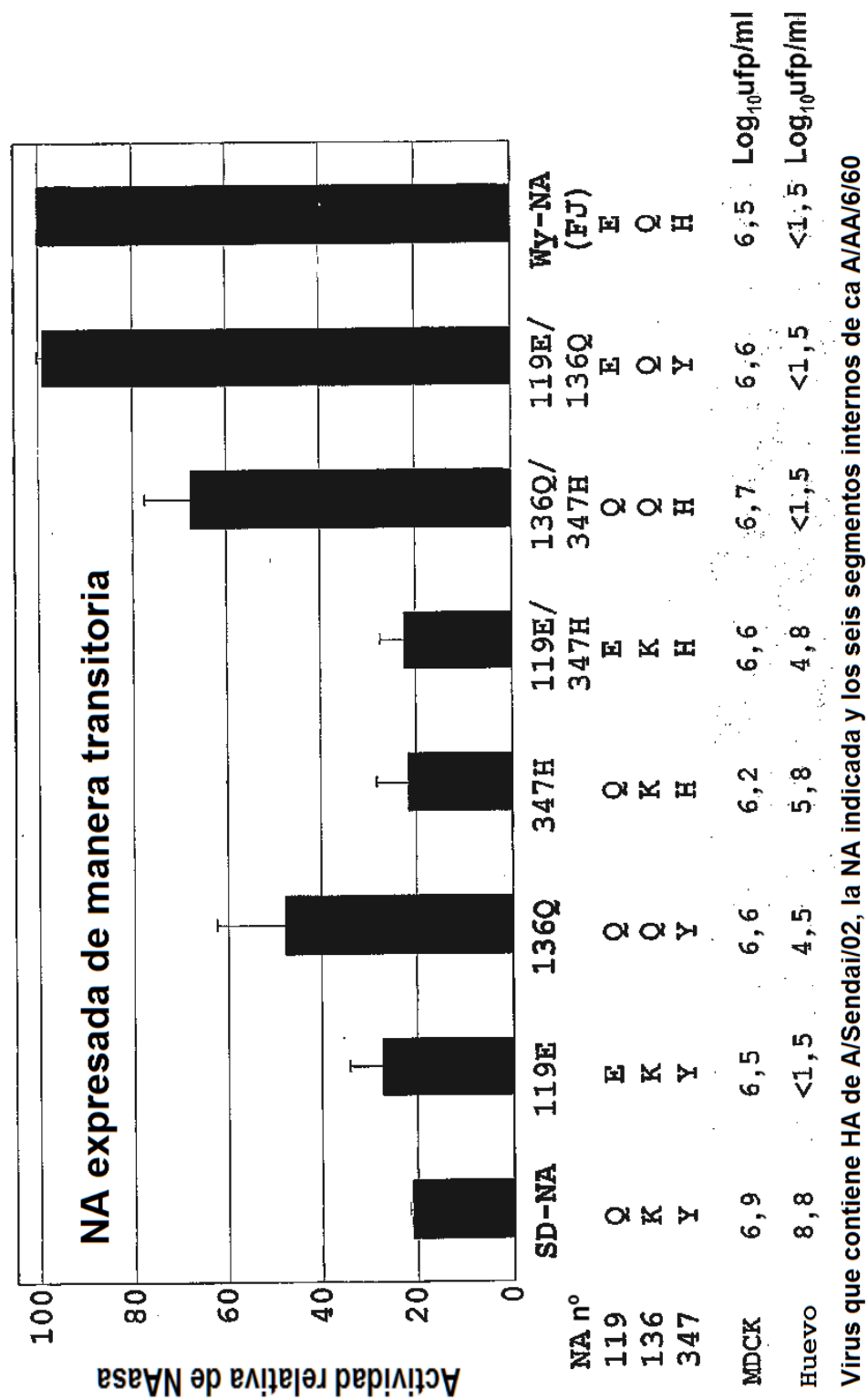
Cepa de virus	A/Sendai	A/Fujian	A/Wyoming ⁽¹⁾
	H/F4962/02	/411/02	/03/03
Aislada	12/4/02	8/11/02	2/13/04
Pases	CXE8/E2	C1/C1	spfPCK2E2/E8
Crecimiento huevo	Sí	No	Sí
Nariz de hurón	Escasa	ND	Buena
128	T	T	A
186	G	G	V
219	S	S	Y/F
226	V	V	T
119	Q ⁽²⁾	E	E
136	K	Q	Q
347	Y	H	H

⁽¹⁾ Cepa de vacuna para 2004-2005

⁽²⁾ Sitio resistente a inhibidores de neuraminidasa

Fig. 29

Fig. 30 Actividades de neuraminidasa de NA y replicación viral



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

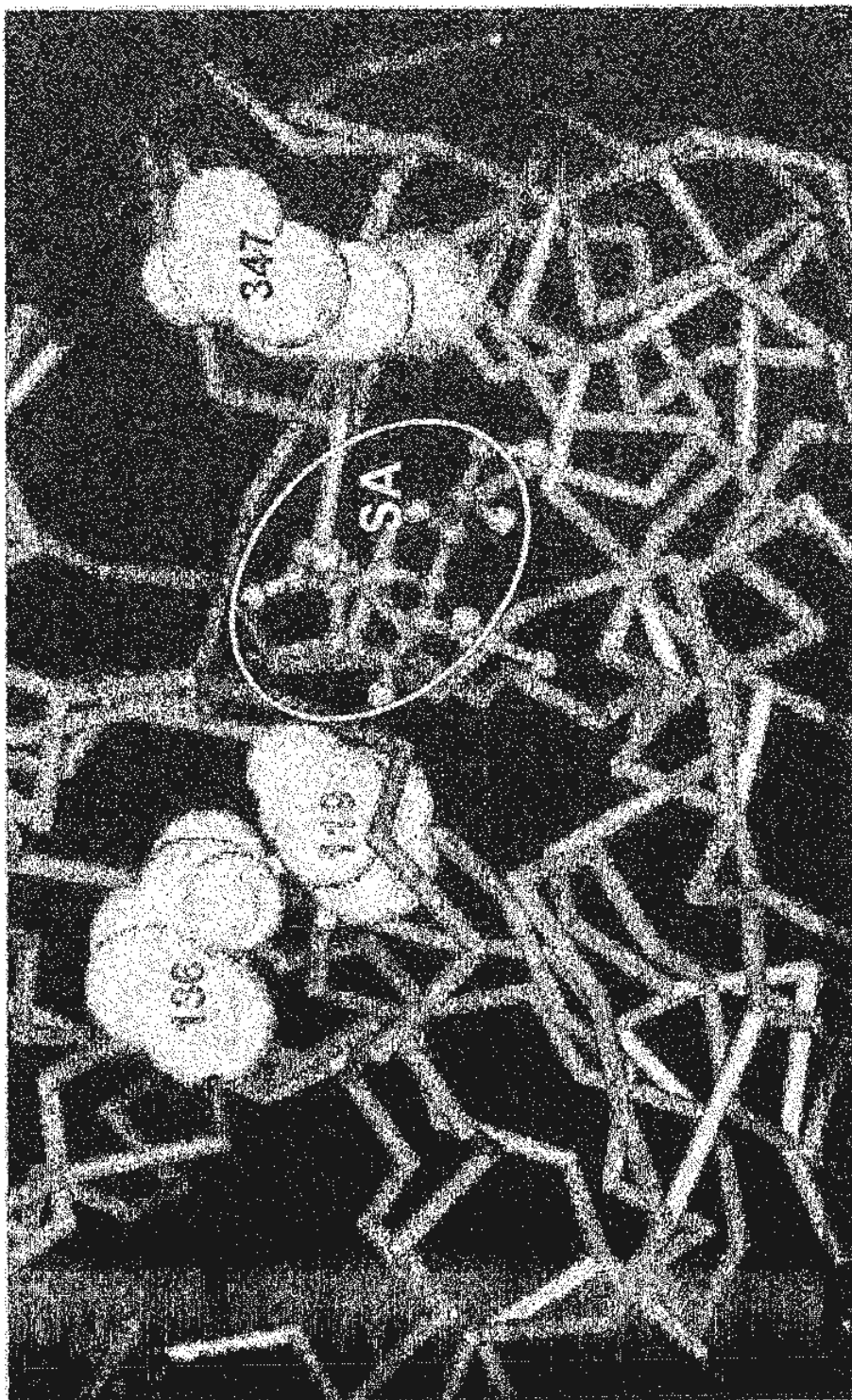


Fig. 31

Efecto de los restos de HA en la replicación del virus en huevos

NA \ HA				Wy-NA 119E/136Q /347H	119E/136Q
128	186	219	226		
T	G	S	V	<1,5	<1,5
T	V	S	V	4,95	4,39
T	G	S	I	5,20	3,85
T	V	S	I	7,38	7,30
T	V	Y	I	7,40	7,40
A	V	Y	I	7,75	7,18

Cuatro restos: HA-186V, 226I y HA-119E, 136Q son suficientes para restaurar la replicación del virus en huevos.

Fig. 32

Adaptación de rA/Fujian/02 en huevos

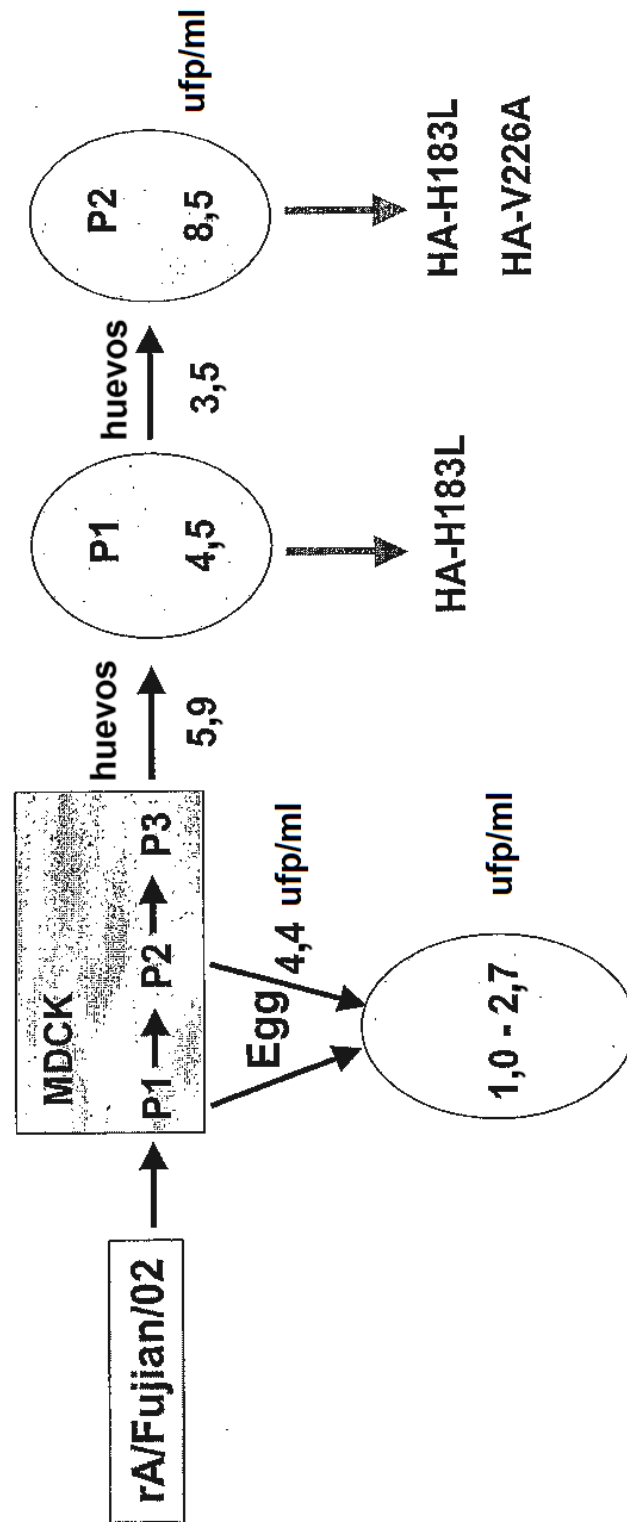


Fig. 33

Sitios de unión a receptor de HA

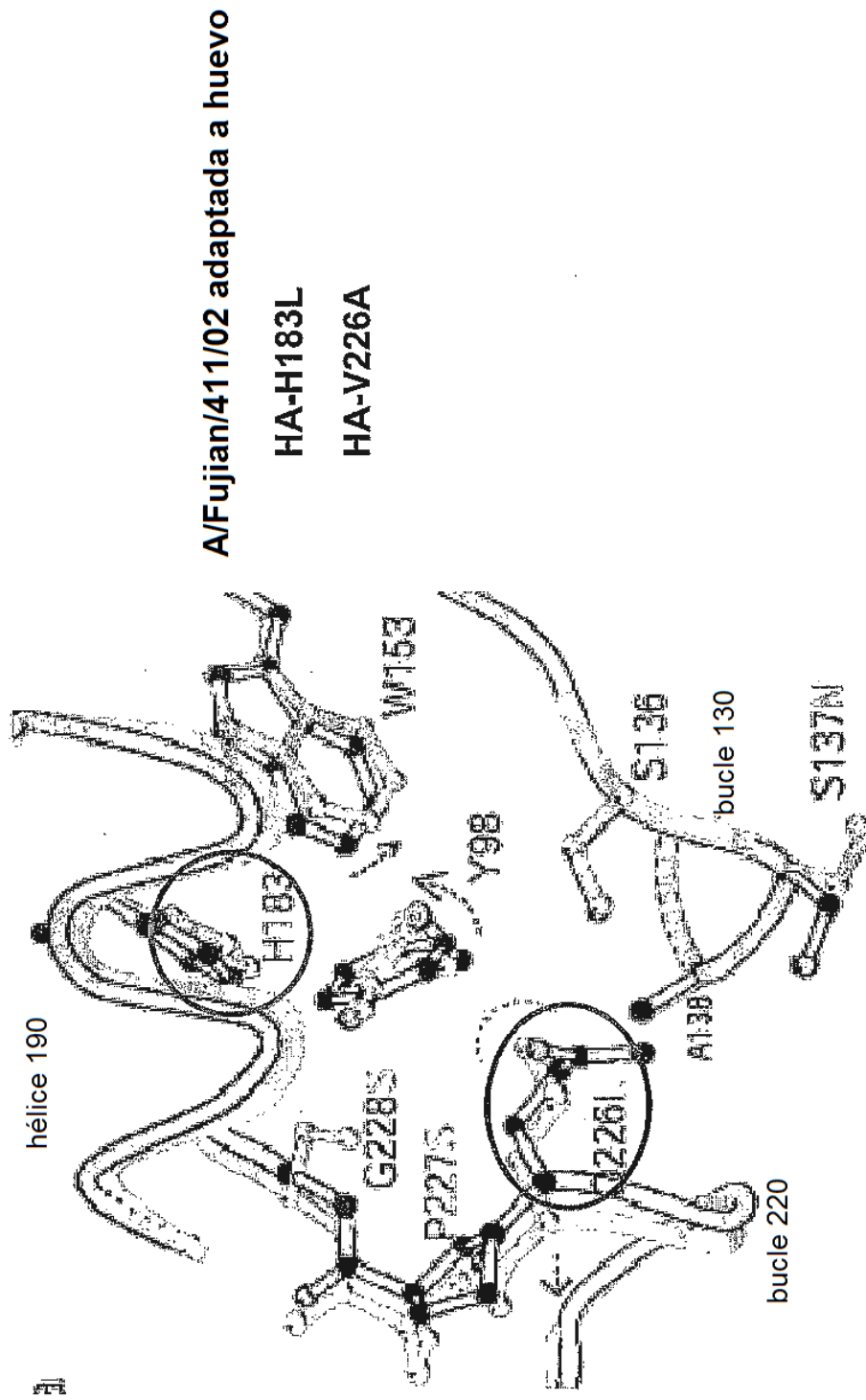


Fig. 34

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

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

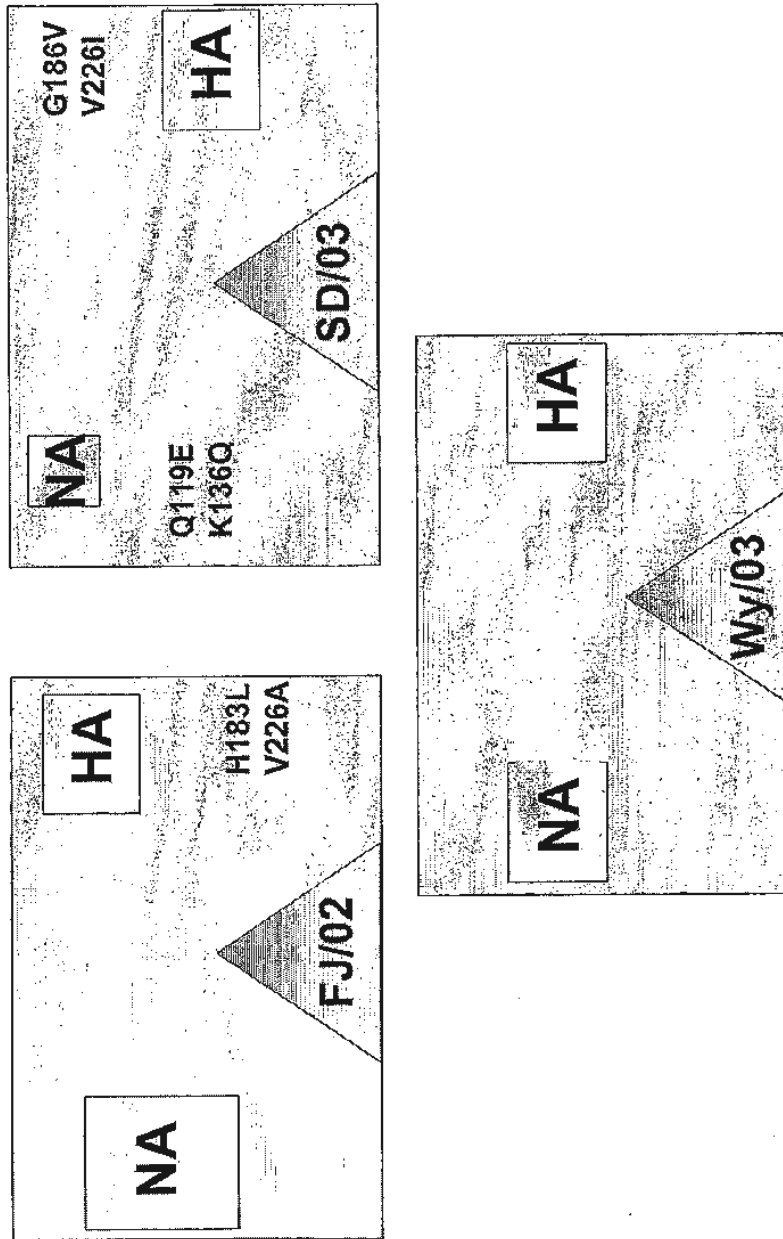


Fig. 35

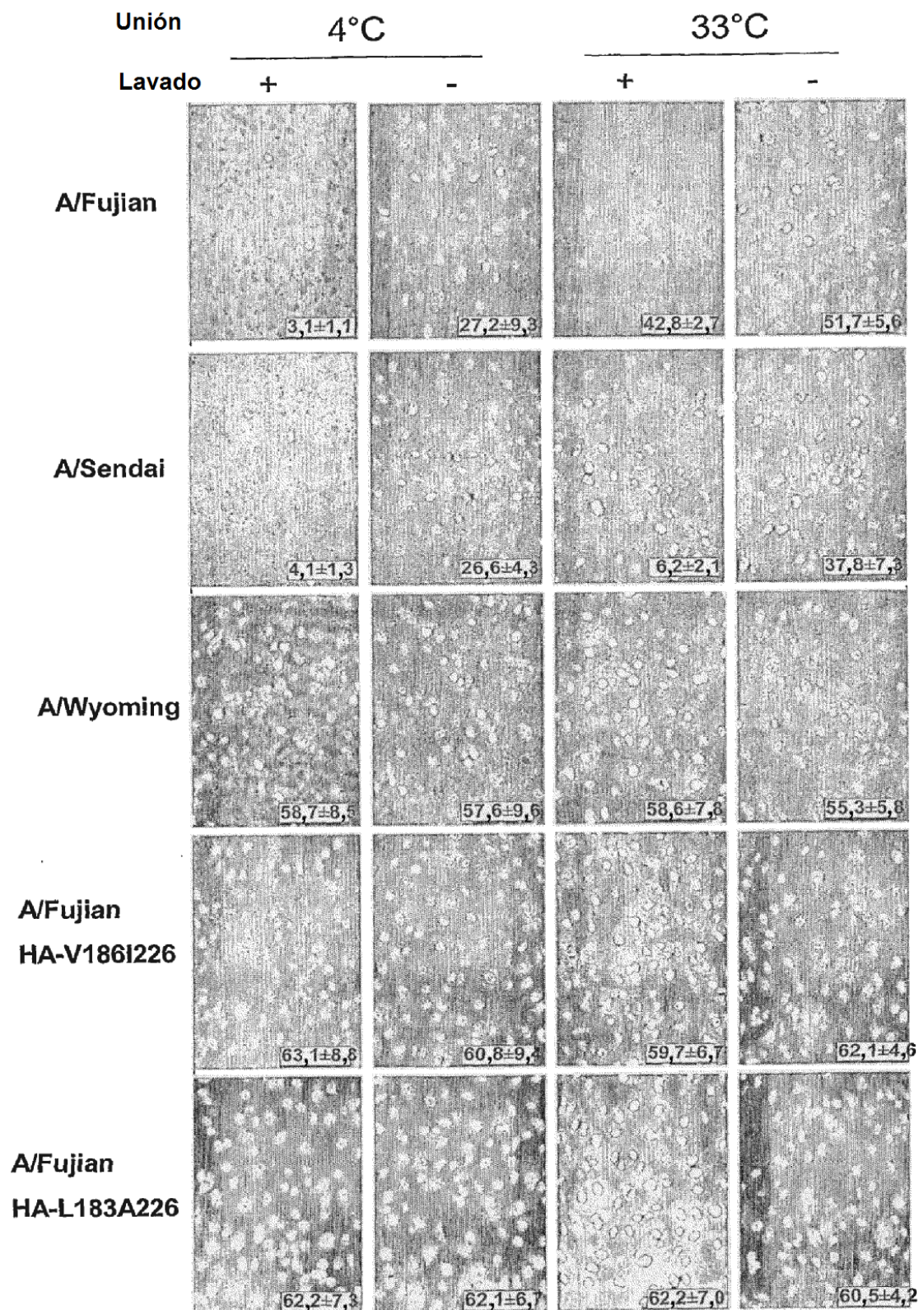


Fig. 36

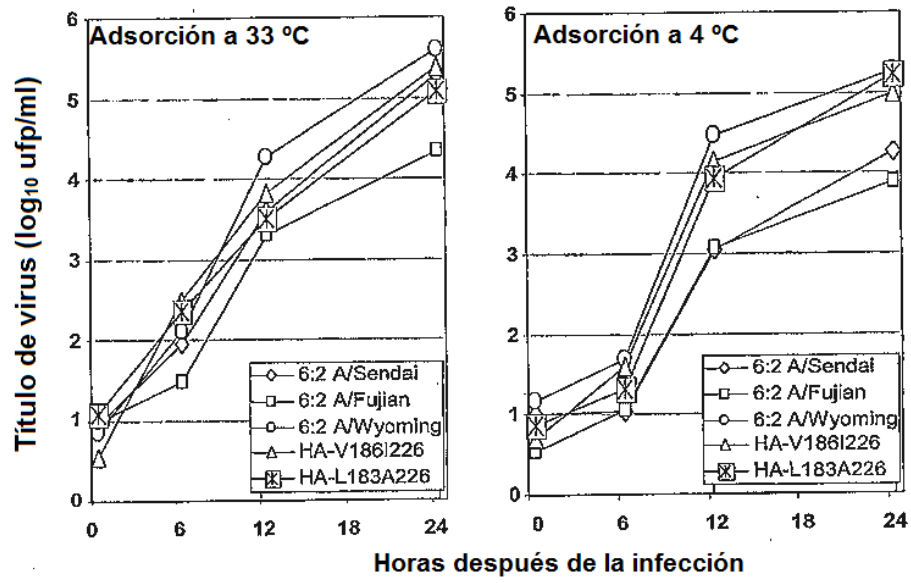


Fig. 37

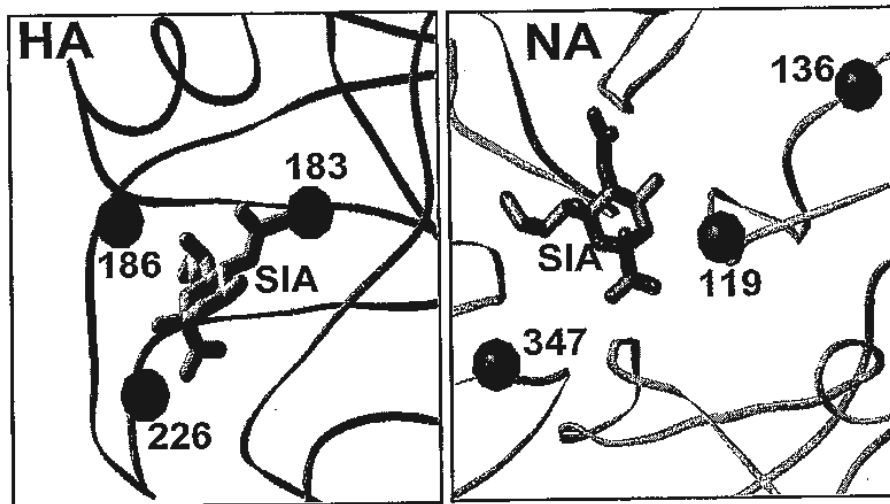


Fig. 38