

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 315**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2010** **E 10734998 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2512508**

54 Título: **Nuevo virus de la gripe**

30 Prioridad:

22.07.2009 US 227638 P
05.11.2009 EP 09175096

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2016

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (100.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH

72 Inventor/es:

MUSTER, THOMAS;
ROMANOVSKAYA-ROMANKO, EKATERINA;
KISELEV, OLEG;
WOLSCHEK, MARKUS;
FERKO, BORIS y
EGOROV, ANDREJ

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 557 315 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

Nuevo virus de la gripe

- 5 La presente divulgación proporciona un nuevo virus de la gripe en el que los segmentos génicos NS y PB1 están modificados y en el que el ORF PB1-F2 está modificado por la introducción de al menos un codón de terminación. De acuerdo con la invención, el virus de la gripe carece de proteínas NS1 y PB1-F2 funcionales y su replicación es deficiente en células competentes para el interferón.
- 10 Adicionalmente, se proporciona una formulación vacunal que comprende dicho virus de la gripe modificado y su uso para la prevención de la infección de gripe.

Antecedentes de la invención

- 15 El virus de la gripe A es uno de los agentes patógenos más comunes que amenazan a los seres humanos y animales, con potencial para producir pandemias desastrosas. El virus de la gripe A produce entre 300.000-500.000 muertes en el mundo cada año, y en años de pandemia, este número puede aumentar hasta 1 millón (1957-1958) o puede ser de hasta 50 millones, como se produjo en 1918-1919. Más recientemente, los virus de la gripe aviar (H5N1) altamente patógenos han generado una gran preocupación con respecto a su potencial para producir una
- 20 pandemia. Las infecciones por el H5N1 en seres humanos se vieron en Hong Kong en un pequeño brote en 1997 que dio como resultado 18 infecciones humanas y seis muertes, y que ha alcanzado hasta ahora 383 casos humanos con un 61 % de tasa de mortalidad.

- 25 Las vacunas de gripe inactivadas que están permitidas en Europa tienen una eficacia de protección limitada especialmente en la población anciana y en niños pequeños que nunca han experimentado una gripe natural. Las vacunas vivas de gripe adaptadas al frío son más eficaces en niños para prevenir y frenar la diseminación de la enfermedad, pero ahora pueden utilizarse nuevas tecnologías tales como la genética inversa para una mejora adicional de la estrategia de vacuna viva.

- 30 El concepto de las vacunas vivas atenuadas actuales se basa en la generación de una “cepa principal” atenuada sensible a la temperatura, que se adapta a crecer a 25 °C (adaptación al frío). Las vacunas de virus vivos adaptados al frío e inactivados estimulan el sistema inmunitario de maneras diferentes, aunque en ambos casos carecen de suficiente inmunogenicidad especialmente en personas ancianas lo que es uno de los inconvenientes más importantes de la vacunación de gripe.

- 35 Aunque las vacunas con virus de la gripe vivo adaptado al frío se consideran suficientemente seguras, los mecanismos exactos de atenuación genéticos y moleculares no se entienden completamente. Se ha afirmado que la naturaleza de la seguridad de las vacunas de gripe adaptadas al frío se basa en un gran número de mutaciones puntuales distribuidas a lo largo de los segmentos génicos internos. Sin embargo, solamente un pequeño número de
- 40 mutaciones mapeadas que se localizan en los genes de polimerasa son las responsables de la atenuación de las cepas víricas adaptadas al frío que son incapaces de replicarse la temperatura corporal normal (Herlocher, M. L., A. C. Clavo, y H. F. Maassab. 1996, Virus Res. 42:11-25; Herlocher, M. L., H. F. *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA. 90:6032-6036). De hecho, a menudo se ha cuestionado la estabilidad genética de las cepas de vacunas vivas ya que los virus re-aislados de los hospedadores vacunados revelan mutaciones puntuales adicionales que pueden
- 45 funcionar eventualmente como mutaciones “supresoras” que producen propiedades potenciadas de la replicación y una posible pérdida del fenotipo *sensible a la temperatura* del virus invertido (Herlocher, M. L., H. F. *et al.*, 1993, Proc.Natl. Acad.Sci. 90:6032-6036, Treanor, J., M. *et al.*, 1994 J Virol. 68:7684-7688.).

- 50 Los nuevos conocimientos de la genética de la gripe proporcionan las directrices para la construcción de cepas vacunales ideales para vacunas vivas en las que se pueden erradicar los factores de patogenidad más importantes por modificación genética dirigida. El virus de la gripe A contiene un genoma ARN de cadena negativa segmentada (Lamb & Krug, 1996). Ocho segmentos codifican las subunidades del complejo transcriptasa (PB1, PB2, PA, nucleoproteína NP), tres proteínas integrantes de la membrana (hemaglutinina HA, neuraminidasa NA, canal de protones M2), la proteína de matriz (M1), la proteína de exportación nuclear (NS2/NEP) y el factor de patogenidad multifuncional no estructural NS1.

- 55 Se ha demostrado que la supresión de la proteína NS1 da lugar a una atenuación significativa del virus de la gripe debido a la falta de replicación en las células u organismos competentes para el interferón (fenotipo deficiente a la replicación). Los virus que carecen la proteína NS1 no son capaces de antagonizar la producción de citocinas en las
- 60 células infectadas, lo que induce efectos de modulación inmunitaria y auto-adyuvantes. La señal de respuesta inmunitaria tras la inmunización con el virus DeINS1 es el desencadenamiento de un tipo de respuesta inmunitaria Th1 asociada con una respuesta de anticuerpos predominantemente del isotipo IgG2A (B. Ferko *et al.* 2002).

- 65 Se ha informado de la existencia de una undécima proteína codificada por un ORF alternativo del segmento 2 (Chen *et al.*, 2001). Esta proteína pro-apoptótica que interactúa con las proteínas ANT3 mitocondriales (translocalizadora del nucleótido adenina 3) y VDAC1 (canal aniónico dependiente de la tensión 1) se considera un factor de

patogenicidad importante. Se observó una inducción dependiente de tipo celular de muerte celular inducida por PB1-F2 en las células inmunitarias hospedadoras que estaban infectadas, pero no en células epiteliales. Es probable que el aumento de la patogenicidad vírica se deba a apoptosis de las células inmunitarias infectadas, que retrasa la respuesta inmunitaria. Se especula que durante los estadios iniciales de replicación vírica, puede alterarse la presentación de antígeno por células presentadoras de antígeno profesionales tales como los macrófagos y las células dendríticas por la función de la PB1-F2.

La supresión del ORF PB1-F2 de varias cepas de gripe producía un efecto de atenuación parcial del virus debido al aclaramiento acelerado del virus en el tracto respiratorio de los ratones (Zamarin D. *et al.*, J. Virol. 2006, 7976-7983). No se sabe nada acerca de la posible implicación de la proteína PB1-F2 en la regulación de la respuesta inmunitaria innata o adaptativa o en las propiedades de crecimiento del virus.

Romanova *et al.* describe la evaluación preclínica de un candidato a la vacuna con gripe H5N1 del NS1 vivo atenuado, deficiente en replicación. La formulación vacunal se estudia en tres modelos animales y se administra a ratones, hurones y macacos. La vacuna no mostró supresión vírica en los animales vacunados tras la administración intranasal (PLOS ONE, Vol 4, Article E5984).

Zell *et al.* describe una evaluación exhaustiva de las secuencias PB1-F2 del virus de la gripe A para ganar una vista detallada de la prevalencia de PB1-F2 (J. Gen. Virology, 2007, 88, pp. 536-546).

El documento WO 2008/043805 describe la anfotericina B como suplemento para el cultivo del virus de la gripe.

El documento US 2009/0074804 desvela cepas de gripe aisladas adecuadas para la producción de vacunas para mamíferos que contienen al menos una proteína de gripe modificada.

En vista de las necesidades actuales de suministro de vacunas seguras y eficaces, un objetivo de la invención es mejorar las cepas vacunales actuales en cuanto a su seguridad e inmunogenicidad y desarrollar una nueva generación de vacunas de gripe intranasales adecuadas para la profilaxis de la gripe estacional y pandémica en la población, especialmente en niños pequeños menores de 3 años - el grupo de edad en el que las vacunas parenterales inactivadas convencionales pueden no ser eficaces.

El objetivo se alcanza por la provisión de las realizaciones de la presente invención.

Descripción de la invención

Se ha descubierto sorprendentemente que el potencial inmunógeno del virus Del NS1 recombinado que comprende la falta de una proteína NS1 funcional o que tiene una supresión parcial de la proteína NS1 en ratones se puede reforzar por la modificación o supresión adicional de la PB1-F2. La supresión de la PB1-F2 puede promocionar respuestas inmunitarias IgG1 (tipo Th2) e IgG2a (tipo Th1). Tal efecto muestra que la modificación o supresión doble puede ser deseable para la construcción de cepas vacunales más eficaces para la vacunación intranasal.

De manera alternativa, también se ha descubierto sorprendentemente que el virus de la gripe que comprende segmentos génicos NS y PB1 modificados presenta un aumento del crecimiento en cultivos celulares en las primeras 24 h tras la infección. Estos mutantes dobles, específicamente los que carecen de proteínas PB1-F2 y NS1 funcionales parecen ser capaces de una replicación más eficaz cuando se comparan con las cepas de virus de la gripe que solamente tienen una supresión de la proteína NS1.

1. Un virus de la gripe que carece de proteínas NS1 y PB1-F2 y que es deficiente en la replicación en células competentes para el interferón, en el que se modifica el ORF PB1-F2 introduciendo al menos un codón de terminación por la modificación de cualquiera de las posiciones T120, T153, T222, T234, T255, T270 y G291 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N° 1 y en el que se suprime la proteína NS1.

2. El virus de la gripe del artículo 1, en el que el segmento génico PB1 se modifica por la introducción de múltiples codones de terminación.

3. El virus de la gripe de uno cualquiera de los artículos 1 a 2 que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2 o al menos una parte de la misma.

4. El virus de la gripe de uno cualquiera de los artículos 1 a 3, en el que la proteína PB1-F2 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 4.

5. Una formulación vacunal que comprende el virus de la gripe de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Una vacuna de acuerdo con el artículo 5 que se formula para el suministro intranasal.

7. Una vacuna de acuerdo con los artículos 5 o 6 para su uso en la prevención de la infección por virus de la gripe en un paciente.

La presente divulgación proporciona un virus de la gripe en el que los segmentos génicos NS y PB1 están modificados y divulgación en la que el ORF PB1 (marco de lectura abierto) se ha modificado por la introducción de al menos un codón de terminación o la eliminación de al menos un codón de inicio/metionina sin alteración de la secuencia de aminoácidos de PB1.

Preferentemente, el virus de la gripe es un virus deficiente en replicación.

De acuerdo con la divulgación, el virus de la gripe deficiente en replicación comprende un segmento PB1 que está modificado por la introducción de múltiples codones de terminación y/o la eliminación de codones de metionina en el ORF PB1-F2. Más específicamente, las modificaciones son en cualquiera de las posiciones de nucleótidos T120, T153, T222, T234, T255, T270 y G291 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N° 1.

Incluso más específicamente, la modificación del gen PB1 da como resultado la anulación del marco de lectura abierto (ORF) PB1-F2.

De acuerdo con la divulgación, el virus de la gripe comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 2 o al menos una parte de la misma.

Específicamente, la proteína PB1-F2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 4 o una parte de la misma.

De acuerdo con la divulgación el segmento génico NS del virus comprende una modificación, sustitución y/o supresión de al menos un nucleótido, específicamente que codifica una proteína NS1 truncada, incluso más específicamente que carece completamente de la proteína NS1.

El virus de la gripe puede carecer específicamente de proteínas NS1 funcionales y/o PB1-F2 funcionales.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una formulación vacunal que comprende el virus de la divulgación y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando dicha vacuna formulada específicamente para el suministro intranasal. Además, la divulgación proporciona un método para prevenir la infección por virus de la gripe en un paciente que comprende la administración de la vacuna de la invención a un individuo.

La divulgación proporciona también el uso del virus de la invención para preparar una preparación para prevenir la infección por virus de la gripe en un individuo.

Figuras

Fig. 1: Se infectaron células Vero con variantes víricas delNS1 (delNS1) y delNS1-PB1-delF2 (delNS1-PB1-delF2) como se describe en la sección Materiales y Métodos con mayor detalle. Independientemente de la MOI que se utilice, la variante vírica delNS1-PB1-delF2 se replicaba con títulos TCID50 significativamente mayores 24 horas post infección en comparación con el virus delNS. Los datos indican que la supresión de la proteína F2 tiene un efecto positivo en el crecimiento del virus en el sustrato de producción - las células Vero.

Fig. 2: Los ratones se inmunizaron dos veces con los virus mutantes delNS1-PB1-delF2 (delNSF2) y delNS1 (delNS). Las muestras de suero recolectadas el día 28 tras la primera inmunización (única) y el día 20 tras la segunda inmunización (doble) se analizaron en presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos del virus. Se muestran los títulos de punto final en ratones individuales. Los segmentos de líneas horizontales representan la media geométrica del título del grupo completo de ratones inmunizados con la variante vírica respectiva como se indica en la figura.

Fig. 3: SEC ID 1: secuencia de nucleótidos del gen GHB01 PB1

Fig. 4: SEC ID 2: secuencia de nucleótidos de GHBP1 PB1delF2

Fig. 5: SEC ID 3: secuencia de aminoácidos de la proteína GHB01 PB1 F2

Fig. 6: SEC ID 4: secuencia de aminoácidos de GHB01 PB1delF2 que muestra los codones de terminación introducidos y los codones de inicio/metionina eliminados. Las sustituciones de aminoácidos en comparación con GHB01 PB1 F2 se destacan con letras subrayadas, en negrita.

Fig. 7: Inducción de IFN- α en PBMC humanas, niveles de IFN- α (pg/ml) 6 h p.i.

A, B, C y D muestran los datos de donantes individuales; F es el gráfico resumido (los datos se presentan como una media de los datos de cuatro voluntarios $\pm$ ETM).

Descripción detallada de la divulgación que se hace, y de la invención

La presente divulgación proporciona un virus de la gripe en el que ambos segmentos génicos NS y PB1 están modificados.

Específicamente, el virus de la gripe de la invención es un virus deficiente en replicación.

De acuerdo con la divulgación el gen PB1 se modifica por la introducción de al menos un codón de terminación en el ORF que codifica la proteína PB1-F2.

La expresión “gen” o “segmento génico” o “segmento” se define en la solicitud como el que consiste en la secuencia completa de acuerdo con las SEC ID de la lista o comprenden al menos una parte o fragmento de las mismas.

El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe A, B o C. Preferentemente es un virus de la gripe A. Ejemplarmente, puede ser un H5N1, H3N2, H1 N1 o cualquier derivado recombinado de los mismos.

Se cree que por medio del agotamiento de inmunocitos en el sitio de entrada y replicación del virus, las cepas patógenas de gripe pueden regular negativamente la respuesta inmunitaria innata y el desarrollo de inmunidad específica. Por lo tanto, la proteína PB1-F2 se considera uno de los factores accesorios para la entrada de nuevas cepas pandémicas en la población humana. Todas las cepas de gripe pandémica del siglo XX y la mayoría de las cepas de gripe A H2N2, H3N2 estacionales patógenas codifican una proteína PB1-F2 funcionalmente activa, mientras que la mayoría de las cepas modernas H1 N1 menos patógenas contienen versiones truncadas de esta proteína. No se sabe nada más sobre cómo la supresión de la proteína PB1-F2 puede modular la respuesta inmunitaria.

De acuerdo con la divulgación, el segmento PB1 se puede modificar por la introducción de múltiples codones de terminación en cualquier posición de ácido nucleico del ORF PB1-F2 que dé lugar a la anulación del marco de lectura abierto (ORF) PB1-F2. Específicamente, se modifican todos los codones que codifican el aminoácido metionina. Por ejemplo, las modificaciones pueden ser en cualquiera de las posiciones de nucleótidos T120, T153, T222, T234, T255, T270 y G291 de acuerdo con la numeración de nucleótidos de la SEC ID 1. Más específicamente, los nucleótidos en las posiciones 153, 222 y/o 291 se sustituyen para comprender un codón de terminación.

De acuerdo con la divulgación, la expresión “múltiples codones de terminación” significa que se introducen al menos dos, preferentemente al menos tres codones de terminación en el gen respectivo.

El término “modificación” en conexión con el ORF PB1-F2 significa que se sustituye al menos un nucleótido por un nucleótido diferente lo que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos parental.

Específicamente, el virus de la gripe tiene una modificación del gen PB1 que da como resultado la supresión del ORF PB1-F2 completo. Esto se puede llevar a cabo introduciendo al menos un codón de terminación en el ORF PB1-F2, preferentemente al menos dos codones de terminación, más preferentemente al menos tres codones de terminación. Preferentemente, la introducción de al menos un codón de terminación en el ORF PB1-F2 se lleva a cabo sin alterar la secuencia de aminoácidos de PB1.

Más específicamente, el virus de la gripe contiene una proteína PB1-F2 que comprende al menos uno de los codones de terminación de acuerdo con la SEC ID N° 4, preferentemente, al menos dos, más preferentemente tres codones de terminación de acuerdo con la SEC ID N° 4. Más específicamente, la proteína PB1-F2 tiene la secuencia SEC ID N° 4.

La proteína NS1 del virus de la gripe A es una proteína multifuncional que consiste en aproximadamente 230 aminoácidos y que se sintetiza pronto y abundantemente en la infección. Cuenta con actividades celulares antivíricas y es un factor de virulencia. Por la actividad de su región del extremo carboxilo, la proteína NS1 es capaz de inhibir los mecanismos de procesamiento del ARNm del hospedador. En segundo lugar, facilita la traducción preferente del ARNm por interacción directa con el factor celular de inicio de la traducción. En tercer lugar, uniéndose al ARNbc y la interacción con supuestas cinasas celulares, la proteína NS1 es capaz de evitar la activación de la cinasa activada por ARNbc inducible por interferón (IFN-) (PKR), sistema de 2' 5'-oligoadenilato sintetasa y factores de transcripción de citocinas.

En cuarto lugar, la parte del extremo N de NS1 se une a RIG-I e inhibe la activación corriente abajo de IRF-3, evitando la inducción transcripcional del IFN-β. Por lo tanto, la proteína NS1 inhibe la expresión de los genes del IFN-α e IFN-β, retrasa el desarrollo de apoptosis en las células infectadas y evita la formación del estado antivírico en las células vecinas. Se conocen en la técnica virus de la gripe que contienen modificaciones en la proteína NS1. Por ejemplo, el documento WO 99/64571 describe la anulación completa del segmento génico NS, el documento WO 99/64068 desvela diversos segmentos génicos NS que se han suprimido parcialmente.

El término “modificación” con respecto al NS1 se define como que al menos un nucleótido se inserta, suprime o sustituye por un nucleótido diferente, lo que da como resultado un cambio en la secuencia de nucleótidos parental. De manera alternativa se inserta, suprime o sustituye al menos un aminoácido que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos parental.

La modificación del gen NS puede comprender cualquier modificación, sustitución y/o supresión de al menos un

nucleótido, específicamente el gen NS puede codificar una proteína NS1 truncada o, como una preferencia alternativa, contiene una supresión en el ORF NS1 que da lugar a un virus de la gripe que carece de proteína NS1 funcional.

- 5 De acuerdo con la divulgación, la modificación en la proteína NS1 puede proporcionar un virus de la gripe deficiente en la replicación o un virus de la gripe que muestra una replicación reducida en las células competentes para el interferón.

10 En una estrategia, se mantienen porciones de la región del extremo amino del producto génico de NS1 mientras que se eliminan partes de la región del extremo C del producto génico de NS1.

15 Las mutaciones que se desean específicamente se pueden modificar técnicamente por medio de inserción, supresión o mutación de ácido nucleico en el codón apropiado. En particular, las proteínas NS1 truncadas comprenden aún los aminoácidos 1-60, aminoácidos 1-70, aminoácidos 1-80, aminoácidos 1-90 (el aminoácido del extremo N es el 1), y específicamente 90 aminoácidos, de 1-100 aminoácidos, y específicamente comprende 1-99 aminoácidos; de 1-110 aminoácidos; de 1-120 aminoácidos; o de 1-130 aminoácidos, y específicamente 124 aminoácidos del producto génico del NS1 de tipo silvestre. En una realización alternativa la proteína NS1 modificada comprende una supresión de al menos el 50 % de los aminoácidos de NS1, preferentemente de al menos el 70 %, más preferentemente de al menos el 90 %. De manera alternativa, la funcionalidad de la proteína NS1 puede disminuirse completamente.

20 La proteína NS1 del vector vírico de gripe de acuerdo con la divulgación carece de dominio funcional de unión al ARN. La función primaria de este dominio que se localiza en el extremo amino de la proteína NS1 (aminoácidos 1-73) es la unión al ARNbc e inhibición de la ruta 2'5' oligo (A) sintetasa/RNasa (Min J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, 2006, 103, 7100-7105, Chien *et al.*, Biochemistry. 2004 Feb 24; 43(7):1950-62) así como la activación de una ARN helicasa citoplasmática, RIG-I, proteína I inducible por el ácido retinoico (Yoneyama M. *et al.*, Nat. Immunol., 2004, 5, 730-737).

25 La falta de un dominio funcional de unión al ARN se define de acuerdo con la presente divulgación como una falta completa de capacidad de unión al ARNbc que da lugar a que un virus de la gripe no se pueda replicar en células competentes para el interferón.

30 De acuerdo con la divulgación el dominio efector de la proteína NS1 del vector vírico de gripe no es funcional. El dominio efector interactúa con proteínas celulares para inhibir la exportación del ARNm nuclear. El dominio efector se localiza en la parte del extremo C de la proteína NS1. De acuerdo con Schultz *et al.* el dominio efector se localiza específicamente entre los restos de aminoácidos 117 y 161, otra bibliografía localiza el dominio efector entre el 134 y el 161. El dominio efector de NS1 puede suprimirse completa o parcialmente así como se pueden sustituir o insertar aminoácidos y el dominio efector restante se puede ensayar en cuanto a su funcionalidad como se describe en la técnica (Schultz-Cherry S. *et al.*, J. Virol., 2001, 7875-7881).

35 De acuerdo con la divulgación, los aminoácidos del extremo C relevantes para la actividad de unión se pueden modificar para inhibir la función efectora. Específicamente se modifica al menos un aminoácido en una cualquiera de las posiciones 74 a 230, más específicamente al menos un aminoácido en una cualquiera de las posiciones 116 a 161, más específicamente en una cualquiera de las posiciones 134 a 161. La modificación puede ser una supresión de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 74 a 230, específicamente en las posiciones 116 a 161, más específicamente en las posiciones 134 a 161.

40 Se puede utilizar un sistema de genética inversa en células Vero para desarrollar la recombinación y/o la expresión de cepas del virus de la gripe recombinantes modificadas. La tecnología ya se conoce bien en la técnica (Pleschka S. *et al.*, 1996, J. Virol., 70(6), 4188-4192, Neumann y Kawaoka, 1999, Adv. Virus Res., 53, 265-300, Hoffmann *et al.* 2000, Proc Natl Acad Sci USA. 97:6108-13). De manera alternativa, se puede utilizar la tecnología basada en RNP que describe Enami y Enami (J. Virol, 2000, 74, 12, pp. 5556-5561) para desarrollar las recombinaciones. De manera alternativa, se puede utilizar un sistema de genética inversa en el que está presente un virus auxiliar.

45 Más específicamente, el virus que se selecciona para su uso en la divulgación comprende un gen NS modificado que da lugar a un virus de la gripe que está atenuado, es decir, que es infeccioso y se puede replicar *in vitro* en células o sistemas celulares deficientes para el interferón pero no se replica o muestra una actividad de replicación muy reducida en células competentes para el interferón. De acuerdo con la divulgación la expresión "deficiente en replicación" se define como la tasa de replicación en células hospedadoras competentes para el interferón que es al menos menor del 5 %, preferentemente menor del 1 %, preferentemente menor del 0,1 % que el virus de la gripe de tipo silvestre según se determina por el ensayo de hemaglutinación, el ensayo TCID50 o el ensayo de placas como se conoce bien en la técnica.

50 De acuerdo con la divulgación, los segmentos génicos de gripe se pueden derivar de cepas de gripe diferentes, pandémicas o interpandémicas. Esto puede dar como resultado virus de la gripe recombinados que combinan los genes de las glucoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) de los virus interpandémicos

reales con cinco o seis o siete segmentos de ARN que codifican otras proteínas de la cepa maestra atenuada, por ejemplo una combinación 6/2 que comprende segmentos HA y NA de una cepa diferente, o recombinados 7/1 que comprenden segmentos HA o NA de una cepa diferente o recombinados 5/3 que contienen segmentos HA, NA y M de una cepa circulante respectivamente.

5

De acuerdo con la divulgación, el virus de la gripe carece de NS1 funcional y proteínas PB1-F2 funcionales.

10

La modificación o supresión del marco de lectura de NS1 y PB1-F2 tiene varios efectos positivos. La supresión de uno o dos genes del genoma de los virus vacunales aumenta la estabilidad genética de su fenotipo atenuado y lleva la seguridad a un nivel más alto. En el caso de los mutantes con NS1 parcialmente truncada, que son capaces de replicarse en el tracto respiratorio, la supresión de PB1-F2 aumenta el aclaramiento del virus desencadenado por el sistema inmunitario innato. Además, la supresión de PB1-F2 aumenta la inmunogenicidad de la vacuna debido a una mejor atracción y activación de células inmunocompetentes como los macrófagos o células dendríticas. Tales células que se infectan por el virus mutante con doble supresión dan lugar a niveles más altos de interferón-alfa tempranamente tras la infección en comparación con un virus que contenga solamente la supresión de NS1. La mejor inducción de citoquinas modula y estimula la respuesta inmunitaria adaptativa. Específicamente, la supresión del marco de lectura PB1-F2 además de la NS1 da lugar a niveles aumentados de IgG, específicamente de la respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2A en ratones. La respuesta de anticuerpos más alta proporciona una mejor protección a los animales contra la exposición a virus de la gripe altamente patógeno.

20

Debido al aumento de inmunogenicidad, la dosis del mutante con supresión doble para inducir una respuesta inmunitaria podría ser menor en comparación con la de virus de la gripe que comprende solamente el fenotipo del NS1.

25

Sorprendentemente, la modificación genética del virus por supresión de dos factores de patogenicidad podría incluso aumentar el crecimiento vírico en células Vero tempranamente tras la infección, mejorando la eficacia de producción de cepas vacunales.

30

También está incluida una composición vacunal que comprende una cantidad de inducción inmunógenamente eficaz del virus de acuerdo con la divulgación mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. También puede haber adyuvantes y estabilizantes contenidos en la composición.

35

De acuerdo con la divulgación el término "inmunógeno" significa que el virus es capaz de dar lugar a una respuesta inmunitaria humoral o celular, y preferentemente ambas. Una entidad inmunógena también es antigénica. Una cantidad de inducción inmunógenamente eficaz del virus da lugar a una respuesta inmunitaria humoral o celular, o ambas, cuando se administran a un animal, preferentemente un ser humano.

40

La composición vacunal se puede utilizar para el tratamiento profiláctico de la enfermedad de gripe que comprende la administración a un paciente humano que necesita el tratamiento de una cantidad de inducción inmunológicamente eficaz de la composición.

45

Las composiciones se pueden utilizar en métodos o como medicamentos en la prevención, manejo, neutralización, tratamiento y/o mejora de la infección por el virus de la gripe. Por supuesto se incluye el uso de un virus de la gripe de acuerdo con la divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la gripe.

50

Las composiciones inmunógenas pueden comprender un virus de la gripe o vivo o inactivado de la invención. El virus se puede inactivar por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos comunes utilizan formalina y calor para la inactivación.

55

Puede preferirse una formulación inmunógena viva debido al aumento de inmunogenicidad. La producción de tales formulaciones inmunógenas vivas recombinantes se puede conseguir utilizando métodos convencionales que implican la propagación del virus en un cultivo celular o en huevos embrionados (por ejemplo, huevos embrionados de gallina) seguido por purificación.

60

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en los EE. UU.

65

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica (por ejemplo, la formulación inmunógena o vacuna). Se pueden emplear también soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La formulación se debería seleccionar de acuerdo con el modo de administración. La formulación particular también puede depender de si el virus está vivo o

inactivado.

El término adyuvante se refiere a un compuesto o una mezcla que aumenta la respuesta inmunitaria a un antígeno. El término estabilizantes se refiere a cualquier agente que pueda aumentar la estabilidad del virus de la invención, por ejemplo puede ser soroalbúmina bovina, azúcares, quitosano, dextranos, PEG, etc.

Los métodos de introducción incluyen pero sin limitación las vías intradérmicas, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, epidural u oral. Se prefiere la introducción por vía intranasal.

Puede ser deseable introducir el medicamento en los pulmones por cualquier vía adecuada. La administración pulmonar se puede utilizar también, utilizando por ejemplo un inhalador o nebulizador o se formula con un agente aerosolizante.

La preparación farmacéutica se puede suministrar también con un sistema de liberación controlada, como una bomba.

De manera alternativa, se proporciona una solución para infusión lista para su uso. De manera alternativa, la preparación se puede formular como un polvo que se disuelva en soluciones acuosas adecuadas inmediatamente antes de la aplicación.

La cantidad de la composición farmacéutica de la divulgación que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección en particular dependerá de la naturaleza del trastorno o la afección y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa para emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos adecuados de dosificación para administración son generalmente de aproximadamente 10^4 - 5×10^7 ufp y se pueden administrar una vez, o múltiples veces con intervalos tan frecuentes como se necesite. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación que comprenden 10^4 - 5×10^7 ufp de virus deficientes en replicación mutantes se pueden administrar por vía intranasal, intratraqueal, intramuscular o subcutánea. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

Por supuesto, la divulgación también proporciona un método para prevenir la infección por el virus de la gripe en un paciente que comprende la administración de la vacuna de la invención a un individuo.

La divulgación también proporciona el uso del virus de la invención para preparar una preparación para prevenir la infección por el virus de la gripe en un individuo.

La descripción anterior se entenderá más completamente en referencia a los siguientes ejemplos. Tales ejemplos son, sin embargo, simplemente representativos de los métodos para practicar una o más realizaciones de la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Mutagénesis de PB1-F2

Se hizo la mutagénesis de PB1-F2 utilizando métodos de biología molecular de referencia (por ejemplo, PCR, mutagénesis dirigida) o por síntesis genética a medida en Geneart AG (Alemania). Todas las construcciones se secuenciaron para verificar la ausencia de mutaciones no deseadas.

Tabla 1:

Mutaciones de nucleótidos de acuerdo con la SECID1	Sustituciones de AA en F2 de acuerdo con la SECID3	Posición de AA de acuerdo con la SECID3
T120C	M hasta T	1
T153G	L hasta terminación	12
T222A	L hasta terminación	35
T234C	M hasta T	39
T255C	M hasta T	46
T270C	M hasta T	51
G291A	W hasta terminación	58

T120C: M hasta T
T153G: L hasta terminación
T222A: L hasta terminación
T234C: M hasta T
T255C: M hasta T
T270C: M hasta T
G291A: W hasta terminación

Todas las sustituciones de aminoácidos en el ORF F2 son mutaciones silenciosas con respecto al ORF PB1.

Rescate vírico

5 El rescate vírico de los virus PB1-F2 tipo silvestre y PB1-F2 mutante se hace a partir de plásmidos que utilizan un sistema de 8 plásmidos bidireccional desarrollado por Erich Hoffmann (Hoffmann *et al.* 2000, PNAS 97(11):6108-13).

10 En resumen, las células Vero (recomendadas por la OMS para la producción de vacunas) se co-transfectaron con ocho plásmidos que contenían cada uno los respectivos segmentos de gripe A de acuerdo con un protocolo optimizado previamente. Tras la transfección, las células se incubaron en medio libre de suero que contenía tripsina para permitir la replicación vírica. Habitualmente tres a cuatro días después se observó un fuerte efecto citopático producido por la replicación vírica. En este momento los virus se recolectan y o se congelan hasta un uso posterior o directamente se utilizan para la preparación de reservas de virus.

Cultivo de los virus

15 El cultivo y la evaluación de las características de crecimiento se hacen en cultivo de células Vero libres de suero. Se llevó a cabo la titulación de virus de reserva por el método de TCID₅₀ en placas de 96 pocillos de acuerdo con SOP establecidos.

Materiales y métodos

Ratones e inmunizaciones

25 Los ratones C57Bl hembras adultas jóvenes de aproximadamente ocho semanas de edad, se inmunizaron por vía i.n. dos veces bajo anestesia de éter con dos virus A/Kurgan/5/05delNS1 recombinados (recombinados 6:2 basados en virus de la gripe IVR-116) con o sin ORF PB1-F2. Se ajustó la dosis por ratón a 5,5 lg TCID₅₀ en caso de A/Kurgan/5/05 6:2 delNS1 y 5,4 lgTCID₅₀ en el caso de A/Kurgan/5/05 6:2 delNSdelPB1-F2. El intervalo entre las
30 inmunizaciones fue de 28 días.

Generación de muestras de suero

35 Se recolectó la sangre del plexo venoso retro orbital murino 28 días después de la primera inmunización y el día 20 tras la segunda inmunización. Las muestras de sangre coagularon a temperatura ambiente durante 2 horas y el suero se generó después de la centrifugación (4000 rpm, 10 min), y finalmente se almacenó a -20 °C.

Potencial de crecimiento de las variantes víricas

40 Para evaluar el potencial de las cepas de virus recombinados para crecer en células Vero, se llevaron a cabo ensayos TCID₅₀ a partir de los sobrenadantes recolectados de los pocillos infectados en diferentes momentos. En resumen, se inoculó la monocapa de células Vero nueva (placas de 6 pocillos) con ambos virus recombinados: A/Kurgan/5/05 6:2 delNS y A/Kurgan/5/05 6:2 delNSdelPB1-F2 a una MOI = 0,01; 0,001 y 0,0001 (dos pocillos para cada MOI). Tras 40 min de incubación a temperatura ambiente, las inoculaciones se retiraron y se añadió medio de
45 ensayo (medio Opti-Pro®; Invitrogen), complementado con L-Glutamina 4 mM (GIBCO) y tripsina 5 µg/ml (Sigma). Las células se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂. Tras 24, 48 y 72 horas se combinaron alícuotas (300 µl) de dos pocillos y se congelaron a -80 °C. Luego, se descongelaron todas las muestras y se titularon en células Vero por el ensayo TCID₅₀. Se prepararon diluciones en serie de 10 veces de los sobrenadantes congelados en medio de ensayo. Se añadieron a los pocillos 100 µl de las muestras diluidas a los pocillos de una placa de 96 pocillos que
50 contenía monocapas de células Vero recién preparadas. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 50 min. Se retiró el inóculo y se añadió medio de ensayo nuevo. Se incubaron las células a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 3 días. Los pocillos infectados y no infectados se valoraron microscópicamente y los sobrenadantes se evaluaron también por el ensayo de HA, utilizando un 0,5 % de RBC de pollo. Se calculó el título TCID₅₀ utilizando el método de Reed y Muench.

ELISA

Se llevó a cabo un protocolo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En resumen, se revistieron durante una noche placas Maxisorp Nunc transparentes de 96 pocillos con virus H5N1 recombinados purificados A/Kurgan/5/05 (40 HAU/pocillo) a 4 °C. Las placas se lavaron entonces, se bloquearon durante 30 minutos con PBS que contenía un 0,5 % de I-block (Tropix) y un 0,01 % de Tween (tampón de ensayo) y se añadieron diluciones seriadas de suero (100 µl/pocillo) a los pocillos revestidos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un lavado intensivo, se detectaron los anticuerpos unidos con anti-IgG1 (0,5 µg/ml, Invitrogen) o IgG2a (1 pg/ml, Invitrogen) humana de cabra purificado por afinidad conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (100 µl/pocillo) seguido por etapas adicionales de lavado y posterior adición de sustrato TMB (100 µl/pocillo, KPL). Se paró la reacción con H₂SO₄ 2 M y se midió la densidad óptica (DO) (longitud de onda de medición 450 nm; longitud de onda de referencia 630 nm). El valor de corte se definió como el valor de la DO que excediera 0,15 el valor de absorción medio del suero de control negativo más dos desviaciones típicas.

Aislamiento de esplenocitos

Se recolectaron los bazo de los ratones inmunizados (tres ratones por grupo) el día 10 (ELISPOT de linfocitos T CD8+) y el día 28 después de la sensibilización (ELISPOT de linfocitos T CD4+). Los bazo se disociaron mecánicamente en suspensiones celulares únicas por medio de tamices celulares (Falcon). Los eritrocitos presentes en las soluciones celulares se lisaron con cloruro amónico tamponado con Tris, se lavaron varias veces y finalmente se resuspendieron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía un 10 % de FCS, penicilina, estreptomycin, IL-2 (30 U/ml) y 2-mercaptoetanol 50 µM.

Ensayos ELISPOT

Se llevó a cabo un ensayo de inmunospot ligado a enzimas CD8+ y CD4+ IFN-γ *ex vivo* inmediato (ELISPOT) utilizando los siguientes péptidos sintéticos: ASNENMETM un epítipo CTL inmunodominante restringido por H-2D^b de la nucleoproteína conservada de virus de la gripe A (NP147-155; ELISPOT CD8+) y un grupo de péptidos CD4+ restringidos por H-2D^b IRPNENPAHKSQVLW y INDRNFWRGNGRKT (NP 316-330 y 201-215 respectivamente, ELISPOT CD4+) de la nucleoproteína conservada del virus de la gripe A. En resumen, diluciones seriadas de dos veces de poblaciones celulares derivadas de los bazo murinos se transfirieron a pocillos revestidos con anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ de ratón (MAb R4-6A2, BioLegend). Las células se incubaron durante 24 h (ELISPOT CD8+) o 48 h (ELISPOT CD4+) a 37 °C y un 5 % de CO₂ en DMEM que contenía un 10 % de suero de ternero fetal, IL-2 (30 U/ml), penicilina, estreptomycin, y 2-mercaptoetanol 50 µM en presencia de los péptidos. Se utilizó un MAb anti-IFN-γ biotinilado (XMG1.2, BioLegend) como anticuerpo conjugado, seguido por la incubación de las placas con estreptavidina peroxidasa (0,25 U/ml; Boehringer Mannheim Biochemica). Las células no estimuladas y células estimuladas con TYQRTRALV, un péptido inmunodominante CTL restringido a H-2K^d, sirvieron como controles negativos. Los puntos que representaban las células CD8+ que segregaban IFN-γ se desarrollaron utilizando el sustrato 3-amino-9-etilcarbazon (Sigma) en presencia de peróxido de hidrógeno en acetato sódico 0,1 M, pH 5,0. Los puntos se recontaron con la ayuda de un microscopio de disección y los resultados se expresaron como el número medio de células secretoras de IFN-γ/10⁶ células ± el error típico de la media (ETM) de los cultivos por triplicado. Las células que se incubaron en ausencia de péptidos sintéticos desarrollaban < 15 puntos/10⁶ células.

Inducción de IFN-α en PBMC humanas**Células:**

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación en gradiente con medio de separación de linfocitos (PAA) a partir de sangre venosa de cuatro voluntarios. Las células se lavaron varias veces con medio RPMI 1640 (Gibco) y se congelaron antes de su uso.

Tabla 2:

Virus	Historial de pasajes/modificaciones	TCID ₅₀ /m	Título corto
A/Chicken/Kurgan/5/ 05	Transfección en células Vero: HA, NA de A/Chicken/Kurgan/5/ 05, todos los otros fragmentos de IVR-116; supresión de NS1	5,21*10 ⁷	Kurgan 6:2 ΔNS
A/Chicken/Kurgan/5/ 05	Transfección en células Vero: HA, NA de A/Chicken/Kurgan/5/ 05, todos los otros fragmentos de IVR-116; supresión de PB1 f2; supresión de NS1	1,25*10 ⁷	Kurgan PB1 f2 ΔNS

Los virus se cultivaron en células Vero (3 pasajes); estas células también se utilizaron para la determinación de los títulos de TCID₅₀ de los virus.

Procedimiento de infección de las células:

Un día antes de la infección se descongelaron las células, se lavaron con RPMI 1640 que contenía un 10 % de FBS (Gibco) y se dejó en reposo durante 24 h a 37 °C y un 5 % de CO₂ en alícuotas (1*10⁶ células/tubo). Tras la incubación, se lavaron las células y se infectaron con diversas modificaciones víricas Kurgan a una multiplicidad de infección (moi) de 2 o infectados con simulación (RPMI 1640). Tras un tiempo de inoculación de 30 min, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI 1640 que contenía un 10 % de FCS y se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂. Se recolectaron los sobrenadantes a las 6 h y 24 h (p.i.) y se determinaron los niveles de IFN- α utilizando un kit ELISA cuantitativo específico de citocina.

Ensayo de aclaramiento vírico en ratones

Los ratones se infectaron por vía intranasal con 10⁶ partículas víricas por animal del virus NS1 mutante que comprendía 125 u 80 restos de aminoácidos en combinación (o sin) con la supresión del marco de lectura PB1-F2. Los días 2, 4, 6, 7 y 8 tras la infección se retiraron los pulmones de los ratones y se evaluó la carga vírica por titulación de homogeneizados pulmonares (TCID₅₀) en células Vero. Se definió el primer día del aclaramiento vírico completo (falta de virus detectable) en los pulmones.

Protección en los ratones contra la exposición a una cepa H5N1 altamente patógena

Se inmunizaron grupos de ratones (n=20) por vía intranasal con dosis iguales de dos virus recombinados que contenían las glucoproteínas de superficie HA y NA de la cepa A/Chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) y que mantenían la supresión única de NS1 o doble NS1/PB1-F2 como factores de atenuación. Cuatro semanas más tarde los ratones se expusieron por vía intranasal a la cepa de tipo silvestre altamente patógena homóloga A/Chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) en una dosis de 50 DL₅₀. Se controló la mortalidad tras la exposición durante 15 días y se definió el porcentaje de animales muertos.

Resultados

La variante DeINS1-PB1-F2 muestra un mayor potencial de crecimiento en células Vero

Se infectaron las células Vero con variantes víricas deINS1 y deINS1-PB1-F2 como se describe en la sección Materiales y métodos con más detalle. Independientemente de la MOI utilizada, la variante vírica deINS1-PB1-F2 se multiplicaba con títulos de TCID₅₀ significativamente más altos a las 24 horas tras la infección en comparación con el virus deINS1. Los datos que se muestran en la figura 1 indican que la supresión de la proteína PB1-F2 tiene un efecto positivo en el crecimiento del virus en el sustrato de producción- las células Vero.

Aumento de la inducción de interferón- α por la variante DeINS1-PB1-F2

Se infectaron PBMC humanas de diferentes donantes con dosis iguales de variantes víricas deINS1 y deINS1-PB1-F2 como se describe en la sección Materiales y métodos. Se midió el nivel de interferón-2 α seis horas después de la infección en los sobrenadantes de los cultivos por el kit de ELISA. Parece que el mutante de doble supresión daba lugar a una mayor producción de interferón en los cuatro cultivos de PBMC en comparación con el virus con supresión de NS1 (tabla 3, fig. 7). Por lo tanto, la supresión de la proteína PB1-F2 anula la capacidad del virus para inhibir la respuesta inmunitaria innata tras la infección de células inmunitarias competentes.

Tabla 3: niveles de IFN- α (pg/ml) 6 h p.i.

	IFN- α 6 h p.i.				media	dt	ETM
Kurgan 6:2 Δ NS	48,41	65,43	25,02	90,8	57,41	27,74	13,87
Kurgan 6:2 PB1delf2 Δ NS	69,89	108,94	64,05	134,4	94,32	33,34	16,67
Falso	10,03	11,87	10,72	10,42	10,76	0,79	0,39

Detección de IgG1 e IgG2a específicas de H5 en sueros de ratón

Se analizaron las muestras de suero recolectadas el día 28 tras la primera inmunización y el día 20 tras la segunda inmunización en cuanto a la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de virus (Fig. 2). De manera interesante, los ratones inmunizados con el virus mutante deINS1-PB1-F2 desarrollaron títulos marcadamente mayores de anticuerpos IgG1 específicos del virus después de la primera inmunización mientras que los ratones inmunizados con el virus parental deINS1 necesitaban una inmunización de refuerzo para alcanzar niveles de IgG1

específica del virus comparables a los de los ratones sensibilizados con la variante delNS1-PB1-F2. Con respecto a anticuerpos IgG2a específicos del virus los títulos de la media geométrica (respuesta inmunitaria tipo Th1) eran comparables en ambos grupos de ratones inmunizados tras la primera inmunización, sin embargo, tras la segunda inmunización también se reveló la ventaja de la variante delNS1-PB1-F2.

Estos datos indican que la supresión del marco de lectura F2 en la variante delNS1-PB1-F2 estimula significativamente la respuesta inmunitaria tipo Th2 y por lo tanto puede contribuir a un espectro más amplio de anticuerpos específicos del virus y aumento de la protección de los hospedadores inmunizados.

En la figura 2 se muestran los resultados cuando se inmunizaron los ratones dos veces con los virus mutantes delNS1-PB1-F2 y delNS. Se analizaron las muestras de suero recolectadas el día 28 tras la primera inmunización (única) y el día 20 tras la segunda inmunización (segunda) en cuanto a la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos del virus. Se muestran los títulos de puntos finales de ratones individuales. Los segmentos lineales horizontales representan el título de la media geométrica del grupo entero de ratones inmunizados con la variante vírica respectiva como se indica en la figura.

Determinación de la respuesta inmunitaria de linfocitos T en ratones

Los ratones inmunizados con la variante vírica delNS-PB1-F2 eran capaces de desarrollar las mismas magnitudes de linfocitos T CD6+ específicos de virus en comparación con los ratones inmunizados con el virus delNS. La estimulación de linfocitos T CD4+ específicos de los ratones con epítomos peptídicos auxiliares dieron como resultado en ambos grupos de ratones inmunizados con el virus, linfocitos T CD4+ que formaban puntos de IFN- γ con baja frecuencia cerca del intervalo de los ratones de control.

Tabla 4. Determinación de respuestas inmunitarias de linfocitos T en ratones inmunizados.

Grupo de inmunización (Virus)	Células formadoras de puntos de IFN- γ /10 ⁶ células ($\pm$ E.T.M.)	
	linfocitos T CD8+	linfocitos T CD4+
delNS	51 (11,3)	31 (3,3)
delNSdelPBF2	50 (3,3)	25
control	<10	22

Los bazos de los ratones inmunizados y de control se obtuvieron los días 10 (ELISPOT de linfocitos T CD8+) y 28 (ELISPOT de linfocitos T CD4+) tras la inmunización de tres ratones por grupo y se agruparon, se disociaron en poblaciones celulares únicas y se llevó a cabo el ensayo ELISPOT como se describe en la sección de Materiales y métodos. Se muestra la media de células secretoras de IFN- γ por millón de células más el error típico de la media (E.T.M.).

Aclaramiento de los virus mutantes con NS1 parcialmente truncada a partir del tracto respiratorio del ratón

Al contrario que con los virus con supresión completa de NS1 que son deficientes en replicación *in vivo*, los virus con proteínas NS1 truncadas solo parcialmente, a saber, que comprenden los aminoácidos 1-125 o restos de aminoácidos 1-80 son capaces de replicarse hasta cierto punto en el tracto respiratorio de los ratones. Estos mutantes víricos que contenían o no contenían marco de lectura abierto PB1-F2 activo se comparan en cuanto al alcance y la duración de la replicación vírica en las diferentes partes del tracto respiratorio. El experimento permite demostrar un aumento de la atenuación de los virus que contienen la supresión de la proteína PB1-F2. El ejemplo muestra que la supresión adicional del factor de patogenicidad PB1-F2 asegura el perfil de seguridad de las cepas vivas vacunales intranasales atenuadas (competentes para la replicación).

La supresión de la PB1-F2 aumenta la eficacia de la vacuna deficiente en replicación intranasal

La inmunización intranasal única de ratones con 5 log de dos virus vacunales modelo que contienen una supresión única de NS1 o doble de NS1/ PB1-F2, que se basa en un virus A/Chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), eran capaces de inducir protección contra la mortalidad inducida por la exposición a la cepa homóloga altamente patógena en un grado diferente. La vacuna basada en un virus con doble supresión protegía el 100 % de los animales, mientras que solamente el 37 por ciento de los animales estaban protegidos tras la inmunización con el virus mutante con supresión de NS1. En el grupo de control de simulación inmunizado con PBS el nivel de mortalidad había alcanzado el 95 % durante el periodo de observación de 15 días. Por lo tanto el virus vacunal mutante con doble supresión NS1/PB1-F2 es superior en eficacia de protección en comparación con un virus vacunal que contiene solamente una supresión única de NS1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AVIR GREEN HILLS BIOTECHNOLOGY RESEARCH DEVELOPMENT TRADE AG

5 <120> Nuevo virus de la gripe

<130> GH009P

<160> 4

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 1

20

```

agcgaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ctttactttt cttgaaaatt      60
ccagcgcaaa atgccataag caccacattc ccttatactg gagatcctcc atacagccat      120
ggaacaggaa caggatacac catggacaca gttaacagaa cacatcaata ttcagaaaaa      180
gggaaatgga caacaaacac agaaactggg gcgcccacac ttaaccgat tgatggacca      240
ctacctgagg ataatgagcc aagtggatat gcacaaacag actgtgtcct ggaagctatg      300
gctttccttg aggaatccca cccagggatc tttgaaaact cgtgccttga aacaatggaa      360
gtcgttcaac aaacaagagt ggacagactg acccaaggtc gtcagacctg tgattggaca      420
ttaaacagaa atcaaccagc cgcaactgca ttagccaaca ctatagaagt tttcagatcg      480
aatggtctaa cagctaata gtcgggaagg ctaatagatt tctcaagga tgtgatggaa      540
tcaatggata aagaggaaat agagataaca acacacttcc aaagaaaaag aagagtaaga      600
gacaacatga ccaagaaaat ggtcacacaa agaacaatag gaaagaaaaa gcagagagtg      660
aacaagagaa gctatctaata aagagcatta actttgaaca caatgaccaa agatgcagaa      720
agaggtaaata taaagagaag agctatttga acaccgggga tgcaaatcag agggttcgtg      780
tactttgttg aaactctagc taggagcatt tgtgagaagc ttgaacagtc tggacttcca      840
gtaggaggta atgaaaagaa ggccaaactg gcaaattgtg tgagaaagat gatgactaat      900
tcacaagaca cagagctttc tttcacaatt actggagaca atactaagtg gaatgaaaat      960
caaaatcttc gaatgttcct ggcatgatt acatatatca caaaaaatca acctgaatgg      1020
ttcagaaaca tcttgagcat cgcaccata atgttctcaa acaaatggc gagactaggg      1080
aaaggataca tgttcgaaag taagagaatg aagctccgaa cacaatacc agcagaaatg      1140
ctagcaagca ttgacctaaa gtatttcaat gaatcaacaa gaaagaaaat tgagaaaata      1200
aggcctcttc taatagatgg cacagcgtca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc      1260
aacatgctaa gtacggtttt aggagtctca atactgaatc ttgggcaaaa gaaatacacc      1320
aaaacaacat actggtggga tgggcttcaa tctctgatg attttgctct catagtgaat      1380

```

```

gcaccaaadc atgagggaat acaagcagga gtggatagat tctacagaac ctgcaagcta 1440
gtcggaatca atatgagcaa gaagaagtcc tatataaata ggacaggaac atttgaattc 1500
acaagctttt ttatcgcta tggatttggt gccaatTTta gcatggagct gccagtttt 1560
ggagtgtctg ggattaatga atcagctgat atgagcattg gagtaacagt gataaagaac 1620
aacatgataa acaatgacct tggaccagca acagcccaga tggctcttca actgttcac 1680
aaggactaca gatatacata tcggtgccac agaggagaca cacaaattca gacgaggaga 1740
tcatttgagc taaagaagct gtgggagcaa acccgatcaa aggcaggact attggtttca 1800
gatggaggac cgaaottata caatatccgg aatcttcaca tccctgaagt ctgottaaag 1860
tgggagctaa tggatgaaga ctatcagga agactttgta atccccgaa tccatttgct 1920
agccataaag agattgagtc tgtaaacaaat gctgtggtaa tgccagctca tggccagcc 1980
aagagcatgg aatatgacgc tgttgcaact acacactcct ggattcccaa gaggaaccgc 2040
tctattctca acacaagcca aaggggaatt cttgaggatg aacagatgta tcagaagtgc 2100
tgcaacctgt tcgagaaatt tttccccagt agttcataca ggagaccggt tggaatttcc 2160
agcatggtgg aggccatggt gtctagggcc cggattgatg ccagaattga cttcagagct 2220
ggacggatta agaaagaaga gttctccgag atcatgaaga tctgttcac cattgaagag 2280
ctcagacggc aaaaacaatg aatttagctt gtcttcatg aaaaaatgcc ttgtttctac 2340
t 2341

```

<210> 2
 <211> 2341
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> virus de la gripe con gen PB1 modificado (GHB01 PBdelF2)
 <400> 2

ES 2 557 315 T3

agcgaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ctttactttt cttgaaaatt	60
ccagcgcaaa atgccataag caccacattc cettatactg gagatcctcc atacagccac	120
ggaacaggaa caggatacac catggacaca gtgaacagaa cacatcaata ttcagaaaaa	180
gggaaatgga caacaaacac agaaactggg gcgcccac taaaccgat tgacggacca	240
ctacctgagg ataacgagcc aagtggatac gcacaaacag actgtgtcct agaagctatg	300
gctttccttg aggaatccca ccagggatc tttgaaaact cgtgccttga aacaatggaa	360
gtcgttcaac aaacaagagt ggacagactg accdaaggtc gtcagacctt tgattggaca	420
ttaaacagaa atcaaccagc cgcaactgca ttagccaaca ctatagaagt tttcagatcg	480
aatggtctaa cagctaata gtcgggaagg ctaatagatt tcctcaagga tgtgatggaa	540
tcaatggata aagaggaaat agagataaca acacacttcc aaagaaaaag aagagtaaga	600
gacaacatga ccaagaaaat ggtcacacaa agaacaatag gaaagaaaaa gcagagagtg	660

```

aacaagagaa gctatctaata aagagcatta actttgaaca caatgaccaa agatgcagaa 720
agaggtaaat taaagagaag agctattgca acaccogga tgcaaatcag agggttcgtg 780
tactttgttg aaactctagc taggagcatt tgtgagaagc ttgaacagtc tggacttcca 840
gtaggaggta atgaaaagaa ggccaaactg gcaaatgttg tgagaaagat gatgactaat 900
tcacaagaca cagagctttc tttcacaatt actggagaca atactaagtg gaatgaaaat 960
caaaatcctc gaatgttcct ggcgatgatt acatatatca caaaaaatca acctgaatgg 1020
ttcagaaaca tcttgagcat cgcaccata atgttctcaa acaaaatggc gagactaggg 1080
aaaggatata tggtcgaaag taagagaatg aagctccga cacaataacc agcagaaatg 1140
ctagcaagca ttgacctaaa gtatttcaat gaatcaaca gaaagaaaat tgagaaaata 1200
aggcctcttc taatagatgg cacagcgtca ttgagocctg gaatgatgat gggcatgttc 1260
aacatgctaa gtacggtttt aggagtctca atactgaatc ttgggcaaaa gaaatacacc 1320
aaaacaacat actggtggga tgggcttcaa tctctgatg attttgcctc catagtgaat 1380
gcaccaaate atgaggaat acaagcagga gtggatagat tctacagaac ctgcaagcta 1440
gtcggaatca atatgagcaa gaagaagtcc tatataaata ggacaggaac atttgaattc 1500
acaagctttt tttatcgcta tggatttgtg gccaatttta gcatggagct gccagtttt 1560
ggagtgtctg ggattaatga atcagctgat atgagcattg gagtaacagt gataaagaac 1620
aacatgataa acaatgacct tggaccagca acagcccaga tggctcttca actgttcac 1680
aaggactaca gatatacata tcggtgccac agaggagaca cacaattca gacgaggaga 1740
tcatttgagc taaagaagct gtgggagcaa acccgatcaa aggcaggact attggtttca 1800
gatggaggac cgaacttata caatatccgg aatcttcaca tccctgaagt ctgcttaag 1860
tgggagctaa tggatgaaga ctatcagga agactttgta atcccctgaa tccatttgtc 1920
agccataaag agattgagtc tgtaaacaaat gctgtggtaa tgccagctca tggccagcc 1980
aagagcatgg aatatgacgc tgttgcaact acacactcct ggattoccaa gaggaacgc 2040
tctattctca acacaagcca aaggggaatt cttgaggatg aacagatgta tcagaagtgc 2100
tgcaacctgt tcagaaaatt tttcccagc agttcataca ggagaccggc tgggaatttc 2160
agcatggtgg aggcctggt gtctagggcc cggattgatg ccagaattga cttcgagtct 2220
ggacggatta agaaagaaga gttctccgag atcatgaaga tctgttcac cattgaagag 2280
ctcagacggc aaaaacaatg aatttagctt gtccttcag aaaaaatgcc ttgtttctac 2340
t 2341

```

<210> 3

<211> 90

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

<400> 3

Met Glu Gln Glu Gln Asp Thr Pro Trp Thr Gln Leu Thr Glu His Ile
1 5 10 15

Asn Ile Gln Lys Lys Gly Asn Gly Gln Gln Thr Gln Lys Leu Gly Arg
20 25 30

Pro Asn Leu Thr Arg Leu Met Asp His Tyr Leu Arg Ile Met Ser Gln
35 40 45

Val Asp Met His Lys Gln Thr Val Ser Trp Lys Leu Trp Leu Ser Leu
50 55 60

Arg Asn Pro Thr Gln Gly Ser Leu Lys Thr Arg Ala Leu Lys Gln Trp
65 70 75 80

Lys Ser Phe Asn Lys Gln Glu Trp Thr Asp
85 90

<210> 4

<211> 91

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> proteína PB1F2 mutante del virus de la gripe (GHB01 delF2)

<220>

<221> X

<222> (12)..(12)

<223> X = TGA

<220>

<221> X

<222> (35)..(35)

<223> X = TAA

<220>

<221> X

<222> (58)..(58)

<223> X = TAG

<220>

<221> X

<222> (91)..(91)

<223> X = TGA

<400> 4

Thr Glu Gln Glu Gln Asp Thr Pro Trp Thr Gln Xaa Thr Glu His Ile
1 5 10 15

Asn Ile Gln Lys Lys Gly Asn Gly Gln Gln Thr Gln Lys Leu Gly Arg
20 25 30

Pro Asn Xaa Thr Arg Leu Thr Asp His Tyr Leu Arg Ile Thr Ser Gln
 35 40 45

Val Asp Thr His Lys Gln Thr Val Ser Xaa Lys Leu Trp Leu Ser Leu
 50 55 60

Arg Asn Pro Thr Gln Gly Ser Leu Lys Thr Arg Ala Leu Lys Gln Trp
 65 70 75 80

Lys Ser Phe Asn Lys Gln Glu Trp Thr Asp Xaa
 85 90

REIVINDICACIONES

1. Virus de la gripe que carece de proteínas NS1 y PB1-F2 funcionales y que es deficiente en replicación en células competentes para el interferón, en el que el ORF PB1-F2 está modificado por la introducción de al menos un codón de terminación por modificación de cualquiera de las posiciones T120, T153, T222, T234, T255, T270 y G291 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N° 1 y en el que se ha eliminado la proteína NS1.
2. Virus de la gripe de la reivindicación 1, en el que el segmento génico PB1 está modificado por introducción de múltiples codones de terminación.
3. Virus de la gripe de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2 o al menos parte de la misma.
4. Virus de la gripe de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína PB1 F2 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 4.
5. Una formulación vacunal que comprende el virus de la gripe de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 5 que está formulada para el suministro intranasal.
7. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6 para su uso en la prevención de la infección por virus de la gripe en un paciente.

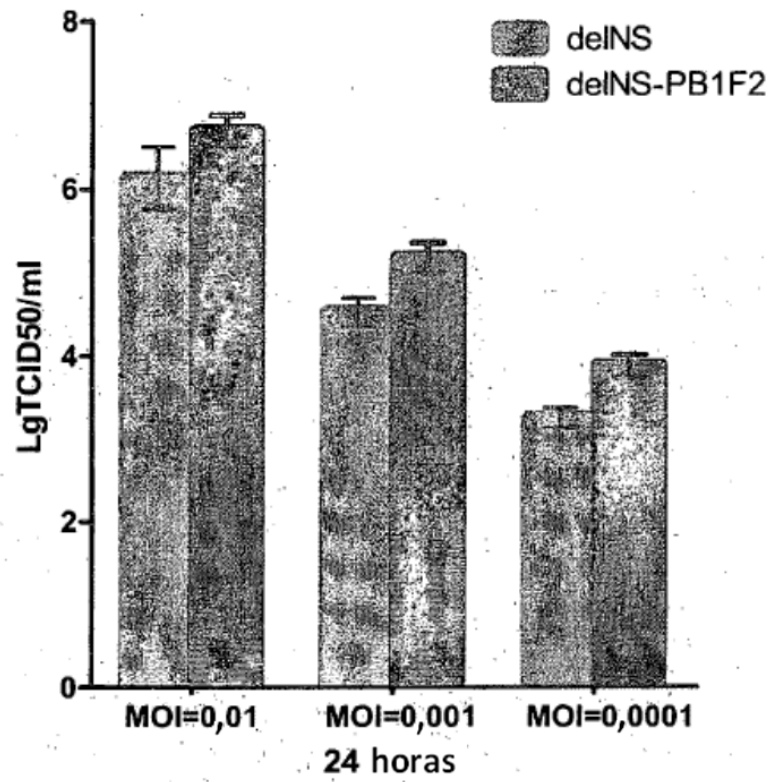


Fig. 1

Fig. 2

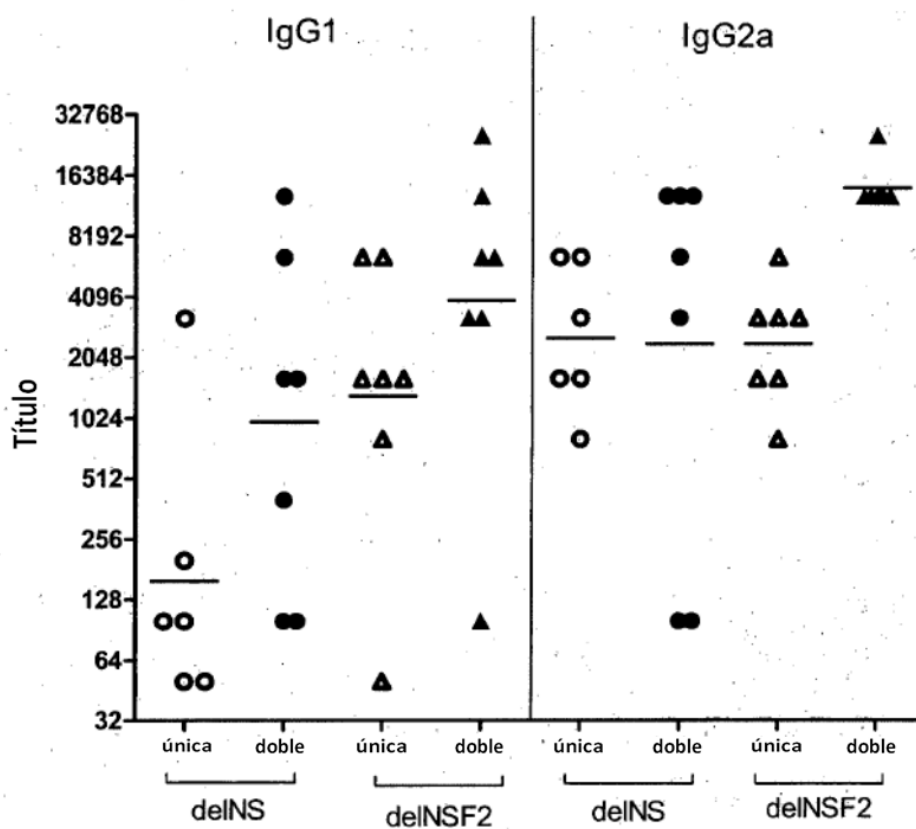


Fig. 3

SECID1: GHB01 PB1

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTGGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTC
 TTGAAAATTCCAGCGCAAATGCCATAAGCACCACATTCCCTTATACTGGAGATC
 CTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTTAACAGAA
 CACATCAATATTCAGAAAAAGGGAAATGGACAACAAACACAGAACTGGGGCGC
 CCCAACTTAACCCGATTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAGCCAAGTGGATA
 TGCACAAACAGACTGTGTCCTGGAAGCTATGGCTTTCCTTGAGGAATCCCACCCA
 GGGATCTTTGAAAACCTCGTGCCTTGAAACAATGGAAGTCGTTCAACAAACAAGAG
 TGGACAGACTGACCCAAGGTCGTCAGACCTATGATTGGACATTAAACAGAAATCA
 ACCAGCCGCAACTGCATTAGCCAACACTATAGAAGTTTTAGATCGAATGGTCTA
 ACAGCTAATGAGTCGGGAAGGCTAATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAA
 TGGATAAAGAGGAAATAGAGATAACAACACACTTCCAAAGAAAAAGAAGAGTAAG
 AGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACACAAAGAACAATAGGAAAGAAAAAGCAG
 AGAGTGAACAAGAGAAGCTATCTAATAAGAGCATTAACTTTGAACACAATGACCA
 AAGATGCAGAAAGAGGTAAATTAAGAGAAGAGCTATTGCAACACCCGGGATGC
 AAATCAGAGGGTTCGTGTACTTTGTTGAACTCTAGCTAGGAGCATTTGTGAGAA
 GCTTGAACAGTCTGGACTTCCAGTAGGAGGTAATGAAAAGAAGGCCAACTGGC
 AAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACACAGAGCTTTCTTTCACAA
 TTAAGTGGAGACAATACTAAGTGGAAATGAAAATCAAATCCTCGAATGTTCTGGC
 GATGATTACATATATCACAAAAATCAACCTGAATGGTTCAGAAACATCCTGAGCA
 TCGCACCCATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTAGGGAAAGGATACATGTT
 CGAAAGTAAGAGAATGAAGCTCCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCTAGCAAG
 CATTGACCTAAAGTATTTCAATGAATCAACAAGAAAGAAAATTGAGAAAATAAGGC
 CTCTTCTAATAGATGGCACAGCGTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTT
 CAACATGCTAAGTACGGTTTTAGGAGTCTCAATACTGAATCTTGGGCAAAAGAAA
 TACACCAAAACAACATACTGGTGGGATGGGCTTCAATCCTCTGATGATTTTGCTC
 TCATAGTGAATGCACCAAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGATTCTA
 CAGAACCTGCAAGCTAGTCGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCCTATATAAAT
 AGGACAGGAACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCCAA
 TTTTAGCATGGAGCTGCCAGTTTTTGGAGTGTCTGGGATTAATGAATCAGCTGAT
 ATGAGCATTGGAGTAACAGTGATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGAC

CAGCAACAGCCCAGATGGCTCTTCAACTGTTTCATCAAGGACTACAGATATACATA
 TCGGTGCCACAGAGGAGACACACAAATTCAGACGAGGAGATCATTGAGCTAAA
 GAAGCTGTGGGAGCAAACCCGATCAAAGGCAGGACTATTGGTTTCAGATGGAGG
 ACCGAACTTATACAATATCCGGAATCTTCACATCCCTGAAGTCTGCTTAAAGTGG
 GAGCTAATGGATGAAGACTATCAGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCATTG
 TCAGCCATAAAGAGATTGAGTCTGTAAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCTCATGG
 TCCAGCCAAGAGCATGGAATATGACGCTGTTGCAACTACACACTCCTGGATTCCC
 AAGAGGAACCGCTCTATTCTCAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAAC
 AGATGTATCAGAAGTGCTGCAACCTGTTGAGAAATTTTTCCCAGTAGTTCATA
 CAGGAGACCGGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCC
 GGATTGATGCCAGAATTGACTTCGAGTCTGGACGGATTAAGAAAGAAGAGTTCTC
 CGAGATCATGAAGATCTGTTCCAGCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAACAATGA
 ATTTAGCTTGTCCTTCATGAAAAAATGCCTTGTTTCTACT

Fig. 4

SECID2: GHB01 PB1delF2

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTGGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTC
TTGAAAATTCCAGCGCAAAATGCCATAAGCACCACATTCCCTTATACTGGAGATC
CTCCATACAGCCACGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTGAACAGAA
CACATCAATATTCAGAAAAAGGGAAATGGACAACAAACACAGAACTGGGGCGC
CCCAACTAAACCCGATTGACGGACCACTACCTGAGGATAACGAGCCAAGTGGAT
ACGCACAAACAGACTGTGTCCTAGAAGCTATGGCTTTCCTTGAGGAATCCCACCC
AGGGATCTTTGAAAACCTCGTGCTTGAACAATGGAAGTCGTTCAACAAACAAGA
GTGGACAGACTGACCCAAGGTCGTCAGACCTATGATTGGACATTAAACAGAAATC
AACCAGCCGCAACTGCATTAGCCAACACTATAGAAGTTTTTCAGATCGAATGGTCT
AACAGCTAATGAGTCGGGAAGGCTAATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCA
ATGGATAAAGAGGAAATAGAGATAACAACACACTTCCAAAGAAAAAGAAGAGTAA
GAGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACACAAAGAACAATAGGAAAGAAAAAGCA
GAGAGTGAACAAGAGAAGCTATCTAATAAGAGCATTAACTTTGAACACAATGACC
AAAGATGCAGAAAGAGGTAAATTAAGAGAAGAGCTATTGCAACACCCGGGATG
CAAATCAGAGGGTTCTGTACTTTGTTGAACTCTAGCTAGGAGCATTGTGTGAGA
AGCTTGAACAGTCTGGACTTCCAGTAGGAGGTAATGAAAAGAAGGCCAACTGG
CAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACACAGAGCTTTCTTTTACA
ATTACTGGAGACAATACTAAGTGGAATGAAAATCAAATCCTCGAATGTTCTCTGG
CGATGATTACATATATCACAAAAAATCAACCTGAATGGTTCAGAAACATCCTGAGC
ATCGCACCCATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTAGGGAAAGGATACATGT
TCGAAAGTAAGAGAATGAAGCTCCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCTAGCAAG
CATTGACCTAAAGTATTTCAATGAATCAACAAGAAAGAAAATTGAGAAAATAAGGC
CTCTTCTAATAGATGGCACAGCGTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTT
CAACATGCTAAGTACGGTTTTAGGAGTCTCAATACTGAATCTTGGGCAAAAGAAA
TACACCAAAACAACATACTGGTGGGATGGGCTTCAATCCTCTGATGATTTTGCTC
TCATAGTGAATGCACCAAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGATTCTA
CAGAACCTGCAAGCTAGTCGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCCTATATAAAT
AGGACAGGAACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCCAA
TTTTAGCATGGAGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGGATTAATGAATCAGCTGAT
ATGAGCATTGGAGTAACAGTGATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGAC
CAGCAACAGCCCAGATGGCTCTTCAACTGTTTCATCAAGGACTACAGATATACATA

TCGGTGCCACAGAGGAGACACACAAATTCAGACGAGGAGATCATTTGAGCTAAA
GAAGCTGTGGGAGCAAACCCGATCAAAGGCAGGACTATTGGTTTCAGATGGAGG
ACCGAACTTATACAATATCCGGAATCTTCACATCCCTGAAGTCTGCTTAAAGTGG
GAGCTAATGGATGAAGACTATCAGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCATTTG
TCAGCCATAAAGAGATTGAGTCTGTAAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCTCATGG
TCCAGCCAAGAGCATGGAATATGACGCTGTTGCAACTACACACTCCTGGATTCCC
AAGAGGAACCGCTCTATTCTCAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAAC
AGATGTATCAGAAGTGCTGCAACCTGTTGAGAAATTTTCCCCAGTAGTTCATA
CAGGAGACCGGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCC
GGATTGATGCCAGAATTGACTTCGAGTCTGGACGGATTAAGAAAGAAGAGTTCTC
CGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAACAATGA
ATTTAGCTTGTCTTCATGAAAAAATGCCTTGTTTCTACT

Fig. 5

SECID 3: GHB01 PB1F2

MEQEQDTPWTQLTEHINIQQKKGNGQQTQKLGRPNLTRLMDHYLRIMSQVDM
HKQTVSWKLWLSLRNPTQGSLKTRALKQWKSFNKQEWTD&

Fig. 6

SECID 4: GHB01 delF2

IEQEQDTPWTQ&TEHINIQQKKGNGQQTQKLGRPN#TRLIDHYLRISQVDIH
KQTVS@KLWLSLRNPTQGSLKTRALKQWKSFNKQEWTD&

&...TGA

#...TAA

@...TAG

Fig. 7

