

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 082**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2004** **PCT/US2004/016680**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2004** **WO04112831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2004** **E 04776133 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 1631663**

54 Título: **Virus de la gripe recombinantes a título elevado para vacunas y terapia génica**

30 Prioridad:

28.05.2003 US 473798 P

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

05.12.2016

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

**614 NORTH WALNUT STREET
MADISON, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

KAWAOKA, YOSHIHIRO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 593 082 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

Virus de la gripe recombinantes a título elevado para vacunas y terapia génica

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio a tenor de 35 U.S.C § 119(e) de la fecha de presentación de la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 60/473.798, presentada el 28 de mayo de 2003.

10 Declaración de derechos del Gobierno

La presente invención se realizó con una subvención del Gobierno de los Estados Unidos de América (subvención AI-47446 del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas del Servicio de Sanidad Pública). El Gobierno puede tener ciertos derechos sobre la invención.

15 Antecedentes de la invención

Los virus ARN de sentido negativo se clasifican en siete familias (*Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*) que incluyen patógenos humanos comunes, tales como virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus del sarampión y virus del Ébola, así como virus animales con gran impacto económico en las industrias avícola y ganadera (por ejemplo, virus de la enfermedad de Newcastle y virus de la peste bovina). Las primeras cuatro familias se caracterizan por genomas no segmentados, mientras que las tres últimas poseen genomas compuestos por seis a ocho, tres, o dos segmentos ARN de sentido negativo, respectivamente. La característica común de los virus ARN de sentido negativo es la polaridad negativa de su genoma de ARN; es decir, el ARN viral (ARNv) es complementario al ARNm y, por lo tanto, no es infeccioso por sí mismo. Con el fin de iniciar la transcripción y la replicación viral, el ARNv tiene que transcribirse en un ARNm de sentido positivo o ARNc, respectivamente, mediante el complejo de la polimerasa viral y la nucleoproteína; para virus de la gripe A, el complejo de la polimerasa viral se compone de tres proteínas polimerasa PB2, PB1, y PA. Durante la replicación viral, el ARNc sirve como molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARNv. Para todos los virus ARN de cadena negativa, las regiones no codificantes tanto en los extremos terminales 5' como 3' del ARNv y ARNc son críticas para la transcripción y replicación del genoma viral. A diferencia de los transcritos de ARNm celular o viral, ARNc y ARNv no se protegen con caperuza en el extremo 5' ni se poliadenilizan en el mismo extremo 3'.

Se han esclarecido bioquímicamente y/o en el contexto de la infección viral las funciones básicas de numerosas proteínas virales. No obstante, los sistemas de genética inversa han aumentado drásticamente nuestro conocimiento de los virus ARN no segmentado y no segmentado de cadena negativa con respecto a su replicación y patogenicidad viral, así como el desarrollo de vacunas de virus vivos atenuados. La genética inversa, cuando el término se utiliza en virología molecular, se define como la generación del virus que posee un genoma obtenido a partir de ADNc clonados (para una revisión, véase, Neumann *et al.*, 2002).

Con el fin de iniciar la replicación viral de virus ARN de cadena negativa, el(los) ARNv(s) o ARNc(s) ha(n) de coexpresarse con el complejo de la polimerasa y la nucleoproteína. El virus de la rabia fue el primer virus ARN no segmentado de sentido negativo generado por completo a partir de ADNc clonado: Schnell *et al.* (1994) generaron virus de la rabia recombinantes por medio de la cotransfección de una construcción de ADNc codificante del ARNc de longitud completa y construcciones de expresión de proteínas para las proteínas L, P, y N, todo bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7. La infección por virus vacuna recombinante, que proporcionó ARN polimerasa T7, dio lugar a la generación de un virus infeccioso de la rabia. En este sistema de la polimerasa T7, la transcripción primaria del ARNc de longitud completa bajo el control de la ARN polimerasa T7 resultó en un transcrito de ARNc sin protección con caperuza. No obstante, tres nucleótidos de guanidina, que forman la secuencia de iniciación óptima para la ARN polimerasa T7, se unieron al extremo 5'. Con el fin de crear un auténtico extremo 3' del transcrito de ARNc que es esencial para un ciclo infeccioso productivo, se utilizó la secuencia de la ribozima de hepatitis delta (RzVHD) para la escisión autocatalítica exacta en el extremo 3' del transcrito de ARNc.

Desde el informe inicial de Schnell *et al.* (1994), los sistemas de genética inversa utilizan técnicas similares dirigidas a la generación de numerosos virus ARN no segmentado de cadena negativa (Conzelmann, 1996; Conzelmann, 1998; Conzelmann *et al.*, 1996; Marriott *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2000; Nagai, 1999; Neumann *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 1998; Rose, 1996). Las mejoras del procedimiento de rescate original incluyó la expresión de la ARN polimerasa T7 a partir de estirpes celulares transfectadas de forma estable (Radecke *et al.*, 1996) o a partir de plásmidos de expresión de proteínas (Lawson *et al.*, 1995), o procedimientos de choque térmico para aumentar la eficacia de rescate (Parks *et al.*, 1999). En base al sistema de la polimerasa T7, Bridgen y Elliott (1996) crearon un virus Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*) a partir de ADNc clonados y demostraron la factibilidad de generar artificialmente un virus ARN segmentado de sentido negativo por el sistema de la polimerasa T7.

En 1999, se generó una técnica de genética inversa basada en plásmidos en base a la ARN polimerasa I celular para la generación de un virus de la gripe A segmentado completamente a partir de ADNc clonados (Fodor *et al.*, 1999; Neumann y Kawaoka, 1999). La ARN polimerasa I, una enzima nucleolar, sintetiza el ARN ribosomal que, al

igual que el ARN del virus de la gripe, no contiene estructuras de caperuza en 5' o poliA en 3'. La transcripción de la ARN polimerasa I de una construcción que contiene un ADNc de gripe viral, flanqueado por el promotor de la ARN polimerasa I y secuencias terminadoras, se tradujo en una síntesis de ARNv de la gripe (Fodor *et al.*, 1999; Neumann y Kawaoka, 1999; Neumann y Kawaoka, 2001; Pekosz *et al.*, 1999). El sistema era altamente eficaz, produciendo más de 10^8 partículas infecciosas de virus por ml de sobrenadante de células transfectadas con plásmido, 48 horas post-transfección.

Se necesita un método para preparar ortomixovirus a título elevado, tal como virus de la gripe A, completamente a partir de ADNc clonados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de vectores del virus de la gripe, que comprende

- a) un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB1 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB2 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de HA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NP del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de M del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NS del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, en los que los ADNc para PB1, PB2, PA, NP, M y NS poseen una región codificante para un polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1-6, y en los que los ADNc para HA y NA no poseen SEQ ID NO: 7 u 8, y en el que los vectores con ADNc de la gripe comprenden un promotor de la ARN polimerasa I y una secuencia de terminación de la ARN polimerasa I; y
- b) un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB2 del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NP del virus de la gripe. Preferentemente, dicha composición comprende además un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de HA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de M1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de M2 del virus de la gripe, o un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NS2 del virus de la gripe.

En el presente documento se divulga una molécula de ácido nucleico aislado y/o purificado (polinucleótido) codificante de al menos una de las proteínas de un título elevado, por ejemplo, títulos superiores a 10^9 /ml, por ejemplo, superiores a 10^{10} /ml de virus de la gripe, o su porción, o el complemento de la molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico aislado y/o purificado puede codificar HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M, o NS, o una su porción al tener sustancialmente la misma actividad que un polipéptido correspondiente codificado por una de las SEC ID NOs: 1-8. Como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente la misma actividad" incluye una actividad que es aproximadamente 0,1 %, 1 %, 10 %, 30 %, 50 %, 90 %, por ejemplo, hasta 100 % o más, o un nivel de proteína detectable de aproximadamente 80 %, 90 % o más, la actividad o nivel de proteína, respectivamente, del polipéptido de longitud completa correspondiente.

"Sustituciones conservativas de aminoácidos" se refieren a la intercambiabilidad de residuos con cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas-hidroxilas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos con cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos preferentes de sustitución conservativa de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina; fenilalanina-tirosina; lisina-arginina; alanina-valina; glutámico-aspartico, y asparagina-glutamina.

La molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento puede emplearse para expresar las proteínas de la gripe, para preparar genes quiméricos, por ejemplo, con otros genes virales incluyendo otros genes del virus de la gripe, y/o para preparar un virus recombinante. Por consiguiente, también se divulgan polipéptidos aislados, virus recombinantes, y células huésped en contacto con las moléculas de ácido nucleico o virus recombinantes divulgados

en el presente documento.

Por consiguiente, las composiciones de la invención comprenden vectores o plásmidos aislados y purificados, que expresan o codifican proteínas del virus de la gripe, o expresan o codifican ARNv de la gripe, tanto ARNv nativo como recombinante. Los vectores comprenden ADNc de la gripe, que a no ser que se especifique lo contrario, puede ser, por ejemplo, ADN de la gripe A (por ejemplo, cualquier gen de la gripe A que incluye cualquiera de los 15 subtipos HA o 9 NA), B o C (véanse, los capítulos 45 y 46 de *Fields Virology* (Fields *et al.* (eds.), Lippincott-Raven Publ., Filadelfia, PA (1996)). A no ser que se especifique lo contrario, el ADNc puede encontrarse en orientación sentido o antisentido con respecto al promotor. Por consiguiente, a no ser que se especifique lo contrario, un vector de la invención puede codificar una proteína del virus de la gripe (sentido) o ARNv (antisentido). A no ser que se especifique lo contrario, cualquier promotor o secuencia de terminación de la transcripción adecuado puede emplearse para expresar una proteína o péptido, por ejemplo, una proteína o un péptido viral, una proteína o péptido de un patógeno no viral, o una proteína o péptido terapéutico. Una composición de la invención puede comprender asimismo un gen o marco de lectura abierto de interés, por ejemplo, un gen extraño codificante de un péptido o proteína inmunogénico útil como una vacuna. Por consiguiente, otra realización de la invención comprende una composición de la invención como se ha descrito previamente comprendiendo además un vector que comprende un promotor vinculado a secuencias de virus de la gripe en 5' que comprenden secuencias no codificantes del virus de la gripe en 5' vinculadas a un ADNc de interés vinculado a secuencias del virus de la gripe en 3' que comprenden secuencias no codificantes del virus de la gripe en 3' vinculadas a una secuencia de terminación de la transcripción. Preferentemente, el ADNc se encuentra en orientación antisentido. La introducción de dicha composición en una célula huésped tolerante para la replicación del virus de la gripe da lugar a un virus recombinante que comprende ARNv correspondiente a las secuencias del vector. El promotor en dicho vector para la producción de ARNv puede ser un promotor de la ARN polimerasa I, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor T7, un promotor T3, y el vector comprende opcionalmente una secuencia de terminación de la transcripción, tal como una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III o una ribozima. El ADNc de interés, ya sea en un vector para la producción de ARNv o proteína, puede codificar un epítipo inmunogénico, tal como un epítipo útil en una terapia o vacuna contra el cáncer, o un péptido o polipéptido útil en la terapia génica. En la preparación del virus, el vector o plásmido que comprende el gen o el ADNc de interés puede añadirse a vectores o plásmidos para todos los genes virales de la gripe.

Una pluralidad de los vectores de la invención puede vincularse físicamente o cada vector puede estar presente en un plásmido individual u otro, por ejemplo, vehículo de administración de ácido nucleico, lineal.

A menos que se especifique lo contrario, el promotor o la secuencia de terminación de la transcripción en un ARNv o vector de expresión de la proteína del virus puede ser idéntico o diferente en relación con el promotor o cualquier otro vector. Preferentemente, a menos que se especifique lo contrario, el vector o plásmido que expresa ARNv de la gripe comprende un promotor adecuado para la expresión en al menos una célula huésped particular, por ejemplo, células huésped aviar o de mamífero, tales como células caninas, felinas, equinas, bovinas, ovinas, o de primates incluyendo células humanas, o preferentemente, para la expresión en más de un huésped.

En una realización, a menos que se especifique lo contrario, uno o más vectores para la producción de ARNv comprenden un promotor, incluyendo, entre otros, un promotor de la ARN polimerasa I, por ejemplo, un promotor de la ARN polimerasa I humano, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor T7, o un promotor T3. A menos que se especifique lo contrario, las secuencias de terminación de la transcripción preferentes para los vectores de ARNv incluyen, entre otros, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III, o una ribozima. A menos que se especifique lo contrario, las ribozimas en el alcance de la invención incluyen, entre otros, ribozimas tetrahymena, RNasa P, ribozimas cabeza de martillo, ribozimas en horquilla, ribozima de la hepatitis, así como ribozimas sintéticas.

En una realización, a menos que se especifique lo contrario, un vector para ARNv comprende al menos un promotor de la ARN polimerasa II vinculado a una secuencia de ribozima vinculada a secuencias codificantes virales vinculadas a otras secuencias de ribozima, vinculadas opcionalmente a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II. En una realización, a menos que se especifique lo contrario, al menos 2 y preferentemente más, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, vectores para la producción de ARNv comprenden un promotor de la ARN polimerasa II, una primera secuencia de ribozima, que se encuentra en el extremo 5' en una secuencia correspondiente a las secuencias virales incluyendo secuencias codificantes virales, que se encuentra en el extremo 5' en una segunda secuencia de ribozima, que se encuentra en el extremo 5' en una secuencia de terminación de la transcripción. A menos que se especifique lo contrario, cada promotor de la ARN polimerasa II en cada vector de ARNv puede ser idéntico o diferente al promotor de la ARN polimerasa II en cualquier otro vector de ARNv. Del mismo modo, a menos que se especifique lo contrario, cada secuencia de ribozima en cada vector de ARNv puede ser idéntica o diferente a las secuencias de ribozima en cualquier otro vector de ARNv. En una realización, a menos que se especifique lo contrario, las secuencias de ribozima en un único vector no son idénticas.

La invención también proporciona un método para preparar un virus de la gripe. El método comprende poner en contacto una célula con una composición de la invención, en una cantidad eficaz para producir un virus de la gripe infeccioso. La invención también incluye el aislamiento de un virus de una célula en contacto con la composición. Por consiguiente, la solicitud divulga además un virus aislado, así como una célula huésped en contacto con la composición o virus de la invención. En otra realización, la invención incluye un método para preparar un virus de la gripe, que comprende poner en contacto una célula con un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB1 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB2 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de HA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NP del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de M del virus de la gripe vinculado a una secuencia de transcripción de la terminación, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NS del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB2 del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NP del virus de la gripe, con el fin de producir un virus infeccioso, en los que los ADNc para PB1, PB2, PA, NP, M o NS poseen una región codificante para un polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1-6, y en los que los ADNc para HA y NA no poseen SEQ ID NO: 7 u 8, y en los que los vectores con ADNc del virus de la gripe comprenden un promotor de la ARN polimerasa I y una secuencia de terminación de la ARN polimerasa I.

El método de la invención permite una fácil manipulación de virus de la gripe, por ejemplo, por la introducción de mutaciones atenuantes en el genoma viral. Además, dado que los virus de la gripe inducen una fuerte inmunidad humoral y celular, la invención potencia en gran medida estos virus como vectores de vacunas, en particular en vista de la disponibilidad de variantes naturales del virus, que pueden emplearse secuencialmente, permitiendo su uso repetitivo para terapia génica.

Los métodos para producir virus descritos en el presente documento, que no requieren la infección por virus auxiliar, resultan útiles en estudios de mutagénesis viral, y en la producción de vacunas (por ejemplo, para el SIDA, gripe, hepatitis B, hepatitis C, rinovirus, filovirus, malaria, herpes, y enfermedad de pie y boca) y vectores de terapia génica (por ejemplo, para el cáncer, SIDA, adenosina deaminasa, distrofia muscular, deficiencia de ornitina transcarbamilasa y tumores del sistema nervioso central). Por consiguiente, se divulga un virus para su uso en terapia médica (por ejemplo, para una vacuna o terapia génica).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diagrama esquemático de sistemas establecidos de genética inversa. En el método de transfección de RNP (A), las proteínas NP y polimerasa purificadas se ensamblan en RNPs con uso de ARNv sintetizado *in vitro*. Las células se transfectan con RNPs, seguido por la infección por virus auxiliar. En el método de la ARN polimerasa I (B), un plásmido contiene el promotor de la ARN polimerasa I, un ADNc codifica el ARNv a rescatar, y el terminador de la ARN polimerasa I se transfecta en las células. La transcripción intracelular por la ARN polimerasa I produce un ARNv sintético, que se empaqueta en partículas de virus de la progenie tras la infección por un virus auxiliar. Con ambos métodos, los virus transfectantes (es decir, aquellos que contienen ARN obtenido a partir de ADNc clonado), se seleccionan entre la población del virus auxiliar.

Figura 2. Diagrama esquemático de la generación de construcciones de la ARN polimerasa I. Los ADNc obtenidos a partir de virus de la gripe se amplificaron mediante PCR, se digirieron con *BsmBI* y se clonaron en los sitios *BsmBI* del vector pHH21 (E. Hoffmann, tesis doctoral, Justus, Universidad de Liebig, Giessen, Alemania), que contiene el promotor (P) de la ARN polimerasa I humano y el terminador (T) de la ARN polimerasa I de ratón. El nucleótido de timidina aguas arriba de la secuencia terminadora (*T) representa el extremo 3' del ARN de gripe viral. Las secuencias del virus de la gripe A se muestran en negrita. (SEQ ID NO: 29-40).

Figura 3. Método de genética inversa propuesto para generar virus ARN segmentado de sentido negativo. Los plásmidos que contienen el promotor de la ARN polimerasa I de un ADNc para cada uno de los ocho segmentos de ARN viral, y el terminador de la ARN polimerasa I se transfectan en células junto con los plásmidos de expresión de proteínas. Aunque los virus infecciosos pueden generarse con plásmidos que expresan PA, PB1, PB2 y NP, la expresión de todas las proteínas estructurales restantes (mostradas entre corchetes) aumenta la eficacia de la producción del virus en función del virus generado.

Figura 4. Título de diferentes virus de la gripe.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "aislado y/o purificado" se refiere a la preparación *in vitro*, al aislamiento y/o purificación de un vector, plásmido o virus, de modo que no se asocia con sustancias *in vivo*, o se purifica sustancialmente a partir de sustancias *in vitro*. Una preparación de virus aislado se obtiene generalmente mediante el cultivo y la propagación *in vitro* y está sustancialmente libre de otros agentes infecciosos.

10 Como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente libre" significa por debajo del nivel de detección de un agente infeccioso particular al utilizar métodos de detección convencionales para ese agente.

Un virus "recombinante" es aquel que se ha manipulado *in vitro*, por ejemplo, utilizando técnicas de ADN recombinante para introducir cambios en el genoma viral.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico recombinante" o "secuencia o segmento de ADN recombinante" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, al ADN que se ha obtenido o aislado a partir de una fuente, que puede alterarse posteriormente de forma química *in vitro*, por lo que su secuencia no está presente de manera natural, o corresponde a secuencias presentes de manera natural que no se posicionan como se colocarían en el genoma nativo. Un ejemplo de ADN "obtenido" a partir de una fuente, sería una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil y que a continuación se sintetiza químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de dicho ADN "aislado" de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se escinde o elimina de dicha fuente por medios químicos, por ejemplo, por medio del uso de endonucleasas de restricción, de modo que puede manipularse adicionalmente, por ejemplo, amplificarse, para su uso en la invención, por la metodología desarrollada por ingeniería genética.

Replicación del virus de la gripe

30 Los virus de la gripe A poseen un genoma de ocho ARN monocatenarios de sentido negativo virales (ARNvs) que codifican un total de diez proteínas. El ciclo de vida del virus de la gripe comienza con la unión de la hemaglutinina (HA) a receptores que contienen ácido siálico en la superficie de la célula huésped, seguido de la endocitosis mediada por el receptor. El bajo pH en los endosomas tardíos desencadena un cambio conformacional en la HA, exponiendo de este modo el N-terminal de la subunidad HA2 (el denominado péptido de fusión). El péptido de fusión inicia la fusión de la membrana viral y endosomal, y la proteína de matriz (M1) y los complejos RNP se liberan en el citoplasma. RNPs consisten en la nucleoproteína (NP), que encapsida ARNv, y el complejo de la polimerasa viral, que se forma por las proteínas PA, PB1, y PB2. RNPs se transportan en el núcleo, en el que tiene lugar la transcripción y la replicación. El complejo de la ARN polimerasa cataliza tres reacciones diferentes: la síntesis de un ARNm con la estructura de la caperuza en 5' y poliA en 3' de un ARN complementario de longitud completa (ARNc), y de ARNv genómico utilizando el ADNc como molde. Los ARNv sintetizados recientemente, NP y las proteínas de la polimerasa se ensamblan en RNPs, se exportan desde el núcleo, y se transportan a la membrana plasmática, en la que se produce la gemación de partículas del virus de la progenie. La proteína de la neuraminidasa (NA) desempeña un papel crucial en la infección mediante la eliminación de ácido siálico de sialiloligosacáridos, liberando en consecuencia los viriones recién ensamblados de la superficie celular y previniendo la autoagregación de partículas de virus. Aunque el ensamblaje del virus implica las interacciones proteína-proteína y proteína-ARNv, la naturaleza de estas interacciones es en gran parte desconocida.

Aunque los virus de la gripe B y C son estructural y funcionalmente similares al virus de la gripe A, existen algunas diferencias. Por ejemplo, el virus de la gripe B no posee una proteína M2 con actividad del canal iónico. Del mismo modo, el virus de la gripe virus C no posee una proteína M2 con actividad del canal iónico. No obstante, es probable que la proteína CM1 posea esta actividad. La actividad de una proteína del canal iónico puede medirse por métodos adecuadamente conocidos en la materia, véanse, por ejemplo, Holsinger *et al.* (1994) y el documento WO 01/79273.

Estirpes celulares y virus de la gripe que pueden utilizarse en la presente invención

55 Según la presente invención, cualquier célula que soporta la replicación eficaz del virus de la gripe puede emplearse en la invención, incluyendo las células mutantes que expresan niveles reducidos o disminuidos de uno o más ácidos siálicos que son receptores del virus de la gripe. Los virus obtenidos por medio de los métodos pueden realizarse en un virus de genoma reordenado.

60 Preferentemente, las células son estirpes celulares certificadas, o certificables continuas WHO. Los requisitos para la certificación de dichas estirpes celulares incluyen la caracterización con respecto al menos una de genealogía, características de crecimiento, marcadores inmunológicos, tumorigenicidad, susceptibilidad del virus y condiciones de almacenamiento, así como ensayos en animales, huevos, y cultivo celular. Dicha caracterización se utiliza para confirmar que las células están libres de agentes adventicios detectables. En algunos países, puede requerirse cariólogía. Además, la tumorigenicidad se ensaya preferentemente en células que se encuentran en el mismo nivel de pase que las utilizadas para la producción de vacunas. El virus se purifica preferentemente mediante un proceso

que se ha demostrado que proporciona resultados consistentes, antes de inactivarse o atenuarse para la producción de vacunas (véase, por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud, 1982).

Resulta preferente establecer una caracterización completa de las estirpes celulares que se utilizarán, por lo que pueden incluirse los ensayos de pureza apropiados del producto final. Los datos que pueden utilizarse para la caracterización de una célula que se va a utilizar en la presente invención incluyen (a) información sobre su origen, derivación, y antecedentes del pase; (b) información sobre su crecimiento y características morfológicas; (c) resultados de los ensayos de los agentes adventicios; (d) características distintivas, tales como patrones bioquímicos, inmunológicos, y citogenéticos que permiten que las células se reconozcan con claridad entre otras estirpes celulares; y (e) resultados de los ensayos de tumorigenicidad. Preferentemente, el nivel de pase, o duplicación de la población de la célula huésped utilizada es lo más reducido posible.

Resulta preferente que el virus producido en la célula esté muy purificado antes de la vacuna o la formulación de la terapia génica. En general, los procedimientos de purificación darán lugar a la extensa eliminación del ADN celular, otros componentes celulares, y agentes adventicios. Se pueden utilizar igualmente procedimientos que degradan o desnaturalizan ampliamente el ADN. Véase, por ejemplo, Mizrahi, 1990.

Vacunas

Una vacuna puede comprender proteínas inmunogénicas incluyendo glicoproteínas de cualquier patógeno, por ejemplo, una proteína inmunogénica de una o más bacterias, virus, levaduras u hongos.

Una vacuna completa de virión se concentra por ultrafiltración y después se purifica por centrifugación zonal o por cromatografía. Se inactiva antes o después de la purificación utilizando por ejemplo formalina o beta-propiolactona.

Una vacuna de subunidades comprende glicoproteínas purificadas. Dicha vacuna puede prepararse de la siguiente manera: utilizando suspensiones virales fragmentadas por medio del tratamiento con detergente, se purifican los antígenos de superficie, por ejemplo por medio de ultracentrifugación. Por consiguiente, las vacunas de subunidades contienen principalmente proteínas HA, y también NA. El detergente utilizado puede ser detergente catiónico, por ejemplo, tal como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Bachmeyer, 1975), un detergente aniónico, tal como desoxicolato de amonio (Laver & Webster, 1976); o un detergente no iónico, tal como el comercializado con el nombre TRITON X100. La hemaglutinina también puede aislarse después del tratamiento de los viriones con una proteasa, tal como bromelina; purificada luego por un método, tal como el descrito por Gran y Skehel (1972).

Una vacuna fraccionada comprende viriones que se han sometido al tratamiento con agentes que disuelven lípidos. Una vacuna fraccionada puede prepararse de la siguiente manera: una suspensión acuosa del virus purificado obtenido como se ha descrito previamente, inactivado o no, se trata, con agitación, mediante disolventes lipídicos, tales como éter etílico o cloroformo, asociados con detergentes. La disolución de los lípidos de la envoltura viral conduce a una fragmentación de las partículas virales. La fase acuosa se recupera conteniendo la vacuna fraccionada, constituida principalmente de hemaglutinina y neuraminidasa con su entorno lipídico original eliminado, y el núcleo o sus productos de degradación. A continuación, las partículas infecciosas residuales se inactivan si es que esto aún no se ha realizado.

Vacunas inactivadas. Las vacunas del virus de la gripe inactivadas de la invención se proporcionan mediante la inactivación del virus replicado de la invención utilizando métodos conocidos, tales como, entre otros, tratamiento con formalina o β -propiolactona. Los tipos de vacunas inactivadas que pueden utilizarse en la invención pueden incluir vacunas virales completas (VC) o vacunas de subviriones (VS) (fragmentación). La vacuna VC contiene un virus intacto, inactivado, mientras que la vacuna VS contiene un virus purificado interrumpido con detergentes que solubilizan la envoltura viral que contiene lípidos, seguido de la inactivación química del virus residual.

Además, las vacunas que pueden utilizarse incluyen aquellas que contienen las proteínas de superficie HA y NA aisladas, referidas como vacunas de antígeno de superficie o de subunidades. En general, son similares las respuestas a las vacunas VS y de antígeno superficie (es decir, HA o NA purificada). Una vacuna VC inactivada experimental que contiene un antígeno de NA inmunológicamente relacionado con el virus epidémico y una HA no relacionada parecen ser menos eficaces que las vacunas convencionales (Ogra *et al.*, 1977). Resultan preferentes las vacunas inactivadas que contienen antígenos de superficie relevantes.

Vacunas de virus vivos atenuados. Las vacunas del virus de la gripe vivo atenuado pueden utilizarse asimismo para prevenir o tratar la infección por el virus de la gripe, según etapas de métodos conocidos. La atenuación se consigue preferentemente en una única etapa mediante la transferencia de genes atenuados de un virus donante atenuado a un virus aislado o de genoma reordenado replicado según métodos conocidos (véase, por ejemplo, Murphy, 1993). Dado que la resistencia al virus de la gripe A se media por el desarrollo de una respuesta inmunitaria a las glicoproteínas HA y NA, los genes codificantes de estos antígenos de superficie han de provenir de virus de genoma reordenado o aislados clínicos de alto crecimiento. Los genes atenuados se obtienen a partir del progenitor atenuado. En este enfoque, los genes que confieren atenuación no codifican preferentemente las glicoproteínas HA y NA. De lo contrario, estos genes no podrían transferirse a genomas reordenados que llevan los antígenos de

superficie del aislado del virus clínico.

Muchos virus donantes se han evaluado por su capacidad para atenuar de forma reproducible virus de la gripe. Como ejemplo no limitante, el virus donante adaptado al frío (af) A/Ann Arbor(AA)/6/60 (H2N2) puede utilizarse para la producción de vacunas atenuadas (véanse, por ejemplo, Edwards, 1994; Murphy, 1993). Adicionalmente, las vacunas de virus vivo atenuado de genoma reordenado, pueden generarse apareando el virus donante af con un virus replicado virulento. La progenie de genoma reordenado se selecciona entonces a 25 °C, (restrictiva para la replicación del virus virulento), en presencia de un antisero H2N2, que inhibe la replicación de los virus que llevan los antígenos de superficie del virus donante af atenuado A/AA/6/60 (H2N2).

Una gran serie de genomas reordenados H1N1 y H3N2 se han evaluado en seres humanos y se descubrió que eran satisfactoriamente: (a) infecciosos, (b) atenuados para niños seronegativos y adultos inmunológicamente estimulados, (c) y estables inmunogénica y (d) genéticamente. La inmunogenicidad de los genomas reordenados af iguala su nivel de replicación. Por consiguiente, la adquisición de los seis genes transferibles del virus donante af por nuevos virus naturales ha atenuado de forma reproducible estos virus para su uso en la vacunación de adultos y niños susceptibles.

Otras mutaciones atenuantes pueden introducirse en los genes del virus de la gripe mediante mutagénesis dirigida al sitio para rescatar virus infecciosos que llevan estos genes mutantes. Las mutaciones atenuantes pueden introducirse en regiones no codificantes del genoma, así como en regiones codificantes. Dichas mutaciones atenuantes también pueden introducirse en genes distintos a HA o NA, por ejemplo, el gen de la polimerasa PB2 (Subbarao *et al.*, 1993). Por consiguiente, los nuevos virus donantes también pueden generarse llevando mutaciones atenuantes introducidas por mutagénesis dirigida al sitio, y dichos nuevos virus donantes pueden utilizarse en la reducción de los candidatos de vacuna vivos atenuados de genoma reordenado H1N1 y H3N2 de manera análoga a la descrita previamente para el virus del donante af A/AA/ 6/60. Del mismo modo, otras cepas donantes atenuadas conocidas y adecuadas pueden presentar un genoma reordenado con un virus de la gripe de la invención para obtener vacunas atenuadas adecuadas para su uso en la vacunación de mamíferos (Enami *et al.*, 1990; Muster *et al.*, 1991; Subbarao *et al.*, 1993).

Resulta preferente que dichos virus atenuados mantengan los genes de los virus que codifican determinantes antigénicos sustancialmente similares a los de los aislados clínicos originales. Esto se debe a que el fin de la vacuna atenuada es proporcionar sustancialmente la misma antigenicidad que el aislado clínico original del virus, mientras que al mismo tiempo carece de infectividad en la medida en que la vacuna provoca un cambio mínimo de inducción de una condición patógena grave en el mamífero vacunado.

En consecuencia, el virus puede atenuarse o inactivarse, formularse y administrarse, según métodos conocidos, como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un animal, por ejemplo, un mamífero. Los métodos se conocen adecuadamente en la materia para determinar si dichas vacunas atenuadas o inactivadas han mantenido antigenicidad similar a la del aislado clínico o cepa de alto crecimiento obtenido del mismo. Dichos métodos conocidos incluyen el uso de antiseros o anticuerpos para eliminar virus que expresan determinantes antigénicos del virus donante; selección química (por ejemplo, amantadina o rimantidina); actividad e inhibición de HA y NA; y exploración de ADN (tal como hibridación por sonda o PCR) para confirmar que los genes donantes que codifican los determinantes antigénicos (por ejemplo, genes HA o NA) no están presentes en los virus atenuados. Véanse, por ejemplo, Robertson *et al.*, 1988; Kilbourne, 1969; Aymard-Henry *et al.*, 1985; Robertson *et al.*, 1992.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, adecuadas para la inoculación o para la administración parenteral u oral, que comprenden una composición según la reivindicación 1, comprenden opcionalmente además soluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Las composiciones pueden comprender además agentes auxiliares o excipientes, conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Berkow *et al.*, 1987; Avery's *Drug Treatment*, 1987; Osol, 1980; Katzung, 1992. La composición de la invención se presenta generalmente en forma de dosis individuales (dosis unitarias).

Las vacunas convencionales contienen generalmente de manera aproximada 0,1 a 200 µg, preferentemente 10 a 15 µg de hemaglutinina de cada una de las cepas que se emplean en su composición. La vacuna que forma el constituyente principal de la composición de vacuna de la invención puede comprender un virus de tipo A, B o C, o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, al menos dos de los tres tipos, al menos dos de los diferentes subtipos, al menos dos del mismo tipo, al menos dos del mismo subtipo, o un aislado(s) o genoma(s) reordenado(s) diferente(s). El virus de la gripe humana tipo A incluye los subtipos H1N1, H2N2 y H3N2.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y/o emulsiones estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la materia. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Transportadores o vendajes oclusivos pueden utilizarse para aumentar la permeabilidad de la piel y mejorar la absorción de antígeno. Las formas farmacéuticas líquidas para

administración oral pueden comprender generalmente una solución de liposomas que contiene la forma farmacéutica líquida. Las formas adecuadas para la suspensión de liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, y elixires que contienen diluyentes inertes utilizados comúnmente en la materia, tales como agua purificada. Además de los diluyentes inertes, tales composiciones también pueden incluir adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, aromatizantes, o perfumantes. Véanse, por ejemplo, Berkow *et al.*, 1992; Avery's, 1987; Osol, 1980; y Katzung, 1992.

Cuando una composición de la presente invención se utiliza para la administración a un individuo, puede comprender, además, sales, tampones, adyuvantes, u otras sustancias deseables para mejorar la eficacia de la composición. Se pueden utilizar vacunas, adyuvantes, sustancias que pueden aumentar una respuesta inmunitaria específica. Normalmente, el adyuvante y la composición se mezclan antes de la presentación al sistema inmunitario, o se presentan por separado, pero en el mismo sitio del organismo a inmunizar. Se proporcionan ejemplos de materiales adecuados para su uso en composiciones de vacunas en Osol (1980).

La heterogeneidad en una vacuna puede proporcionarse mediante la mezcla de virus de la gripe replicados al menos en dos cepas del virus de la gripe, tales como 2-50 cepas o cualquier intervalo o valor en el mismo. Resultan preferentes las cepas de virus de la gripe A o B con una composición antigénica actual. Según la presente invención, las vacunas pueden proporcionarse para variaciones en una única cepa de un virus de la gripe, utilizando técnicas conocidas en la materia.

Una composición farmacéutica según la presente invención puede comprender adicionalmente o además al menos un compuesto quimioterapéutico, por ejemplo, para terapia génica, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios o potenciadores inmunitarios, y para vacunas, agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, gammaglobulina, amantadina, guanidina, hidroxibencimidazol, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , factor de necrosis tumoral- α , tiosemicarbarzonas, metisazona, rifampina, ribavirina, un análogo de pirimidina, un análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, didesoxnucleosidas, un inhibidor de proteasa, o ganciclovir. Véanse, por ejemplo, Katzung (1992), y las referencias citadas en el mismo en las páginas 798-800 y 680-681, respectivamente.

La composición puede contener igualmente cantidades variables aunque pequeñas de formaldehído libre de endotoxinas, y conservantes, que se han comprobado que son seguros y no contribuyen a efectos indeseables en el organismo al que se administra la composición.

Fines farmacéuticos

La administración de la composición (o los antisueros que se obtienen) puede tener un fin "profiláctico" o "terapéutico". Cuando se proporciona profilácticamente, las composiciones de la invención que son vacunas, se proporcionan antes de manifestar cualquier síntoma de una infección patógena. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar cualquier infección posterior. Cuando se proporciona profilácticamente, las composiciones de terapia génica de la invención, se proporcionan antes de manifestar cualquier síntoma de una enfermedad. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

Cuando se proporciona terapéuticamente, una vacuna viral atenuada o inactivada se proporciona tras la detección de un síntoma de infección actual. La administración terapéutica del(los) compuesto(s) sirve para atenuar cualquier infección actual. Véanse, por ejemplo, Berkow *et al.*, 1992; Avery, 1987; y Katzung, 1992. Cuando se proporciona terapéuticamente, una composición de terapia génica se proporciona tras la detección de un síntoma o indicio de la enfermedad. La administración terapéutica del(los) compuesto(s) sirve para atenuar un síntoma o indicio de esa enfermedad.

Por consiguiente, una composición de vacuna atenuada o inactivada de la presente invención puede proporcionarse así antes de la aparición de la infección (para prevenir o atenuar una infección anticipada) o después del inicio de una infección actual. Del mismo modo, para la terapia génica, la composición puede proporcionarse antes de manifestar cualquier síntoma de un trastorno o enfermedad o después de detectar uno o más síntomas.

Se dice que una composición es "farmacológicamente aceptable" si su administración puede tolerarse por un paciente receptor. Se dice que dicho agente se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Una composición de la presente invención es fisiológicamente significativa si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor, por ejemplo, mejora al menos una respuesta inmunitaria primaria o secundaria humoral o celular frente al menos una cepa de un virus de la gripe infeccioso.

La "protección" proporcionada no necesita ser absoluta, es decir, la infección de la gripe no tiene por qué prevenirse o erradicarse completamente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población o conjunto de control de pacientes. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o la rapidez de la aparición de los síntomas de la infección por el virus de la gripe.

Administración farmacéutica

Una composición de la presente invención puede conferir resistencia a uno o más patógenos, por ejemplo, una o más cepas del virus de la gripe, ya sea por inmunización pasiva o inmunización activa. En la inmunización activa, una composición de vacuna viva atenuada o inactivada se administra profilácticamente a un huésped (por ejemplo, un mamífero), y la respuesta inmunitaria del huésped en cuanto a la administración protege contra la infección y/o enfermedad. Para la inmunización pasiva, los antisueros obtenidos pueden recuperarse y administrarse a un receptor sospechoso de tener una infección causada por al menos una cepa del virus de la gripe. Una composición de terapia génica de la presente invención puede producir niveles profilácticos o terapéuticos del producto génico deseado mediante inmunización activa.

En una realización, la vacuna se proporciona a una hembra de mamífero (en el embarazo o antes del embarazo o parto), en condiciones de tiempo y cantidad suficientes para provocar la producción de una respuesta inmunitaria que sirve para proteger tanto a la hembra como al feto o recién nacido (a través de la incorporación pasiva de los anticuerpos por la placenta o en la leche de la madre).

Se divulgan métodos para prevenir o atenuar un trastorno o enfermedad, por ejemplo, una infección al menos por una cepa de patógeno. Como se utiliza en el presente documento, se dice que una vacuna previene o atenúa una enfermedad si la administración da lugar a la atenuación total o parcial (es decir, supresión) de un síntoma o condición de la enfermedad, o a la inmunidad total o parcial del individuo hacia la enfermedad. Como se utiliza en el presente documento, se dice que una composición de terapia génica previene o atenúa una enfermedad si su administración da lugar a la atenuación total o parcial (es decir, supresión) de un síntoma o condición de la enfermedad, o a la inmunidad total o parcial del individuo hacia la enfermedad.

Un régimen típico para prevenir, suprimir, o tratar una patología relacionada con el virus de la gripe, comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de vacuna como se describe en el presente documento, se administra como tratamiento único, o se repite como dosificaciones para potenciar o de refuerzo, durante un periodo hasta e inclusive entre una semana y aproximadamente 24 meses, o cualquier intervalo o valor en el mismo.

Según la presente invención, una "cantidad eficaz" de una composición es aquella que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Se entiende que la dosificación eficaz dependerá de la edad, sexo, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, frecuencia de tratamiento, y naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferentes. No obstante, la dosificación más preferente se adaptará al sujeto individual, como entiende y determina un experto en la materia. Véanse, por ejemplo, Berkow *et al.*, 1992; Avery, 1987; y Katsung, 1992.

La dosificación de una vacuna de virus atenuado para un mamífero (por ejemplo, ser humano) u organismo adulto aviar puede presentar aproximadamente 10^3 - 10^7 unidades formadoras de placas (UFP)/kg, o cualquier intervalo o valor en el mismo. La dosis de la vacuna inactivada puede oscilar aproximadamente entre 0,1 y 200, por ejemplo, 50 µg de proteína de hemaglutinina. Sin embargo, la dosis ha de ser una cantidad segura y eficaz como se determina por métodos convencionales, utilizando las vacunas existentes como punto de partida.

La dosificación de HA inmunorreactiva en cada dosis de vacuna de virus replicado puede estandarizarse para contener una cantidad adecuada, por ejemplo, 1-50 µg o cualquier intervalo o valor en el mismo, o la cantidad recomendada por el Servicio de Sanidad Pública de EE. UU. (SSP), que es por lo general de 15 µg por componente para niños mayores de 3 años, y 7,5 µg por componente para niños <3 de años. La cantidad de NA también puede estandarizarse, sin embargo, esta glicoproteína puede ser lábil durante la purificación y el almacenamiento del procesador (Kendal *et al.*, 1980). Cada dosis de 0,5 ml de vacuna contiene de manera preferente aproximadamente 1-50 mil millones de partículas de virus, y preferentemente 10 mil millones de partículas.

La invención se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1Materiales y métodos

Células y virus. Las células de riñón embrionarias humanas 293T y las células de riñón caninas Madin-Darby (MDCK) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y en medio modificado de Eagle (MEM) que contenía suero bovino de recién nacido al 5%, respectivamente. Todas las células se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Los virus de la gripe A/WSN/33 (H1N1) y A/PR/8/34 (H1N1) se propagaron en huevos con 10 días de vida.

Construcción de plásmidos. Para generar construcciones de ARN polimerasa I, los ADNc clonados obtenidos a partir de ARN viral A/WSN/33 o A/PR/8/34 se introdujeron entre las secuencias promotoras y terminadoras de la ARN polimerasa I. En pocas palabras, los ADNc clonados se amplificaron por PCR con cebadores que contienen sitios *BsmBI*, se digirieron con *BsmBI*, y se clonaron en los sitios *BsmBI* del vector pHH21 que contiene el promotor de la

ARN polimerasa I humano y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón, separados por sitios *BsmBI* (Figura 2). Los genes PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M y NS de la cepa A/WSN/33 se amplificaron por PCR al utilizar los siguientes plásmidos: pSCWPB2, pGW-PB1, y pSCWPA (todos obtenidos del Dr. Debi Nayak de la Universidad de California, Los Ángeles), y pWH17, pWNP152, pT3WNA15 (Castrucci *et al.*, 1992), pGT3WM, y pWNS1, respectivamente. El gen PB1 del virus de la gripe A/PR/8/34 se amplificó utilizando pcDNA774 (PB1) (Pérez *et al.*, 1998) como molde. Véase, la Figura 6 para las secuencias de los cebadores. Para garantizar que los genes estaban libres de mutaciones no deseadas, los fragmentos obtenidos a partir de PCR eran las secuencias con un autosecuenciador (Applied Biosystem Inc., CA, EE. UU.) según el protocolo recomendado por el fabricante. Los ADNc codificadores de los genes HA, NP, NA, y M1 del virus A/WSN/33 se clonaron como se ha descrito (Huddleston *et al.*, 1982) y se subclonaron en el vector de expresión eucariota pCAGGS/MCS (controlado por el promotor β -actina de pollo) (Niwa *et al.*, 1991), dando lugar a pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0-14, pCAGGS-WNA15, y pCAGGS-WSN-M1-2/1, respectivamente. Los genes M2 y NS2 del virus A/PR/8/34 se amplificaron por PCR y se clonaron en pCAGGS/MCS, produciendo pEP24c y pCA-NS2. Finalmente, pcDNA774(PB1), pcDNA762(PB2) y pcDNA787(PA) se utilizaron para expresar las proteínas PB2, PB1, y PA bajo el control del promotor de citomegalovirus (Perez *et al.*, 1998).

Generación de partículas infecciosas de la gripe. Las células 293T (1×10^6) se transfectaron con un máximo de 17 plásmidos en cantidades diferentes con el uso de Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) según las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, se mezclaron el ADN y el reactivo de transfección (2 μ l de Trans IT LT-1 por μ g de ADN), se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos y se añadieron a las células. Seis horas más tarde, la mezcla del ADN y el reactivo de transfección se sustituyeron por Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) que contiene seroalbúmina bovina al 0,3 % y suero fetal bovino al 0,01 %. En diferentes momentos después de la transfección, se recogieron los virus del sobrenadante y se titularon en células MDCK. Puesto que no se requirió un virus auxiliar por este procedimiento, los virus transfectantes recuperados se analizaron sin purificación en placa.

Determinación del porcentaje de células transfectadas con plásmido que producen virus. Veinticuatro horas después de la transfección, las células 293T se dispersaron con EDTA al 0,02 % en células únicas. La suspensión celular se diluyó 10 veces y se transfirió a monolapas confluentes de células MDCK en placas de 24 pocillos. Los virus se detectaron mediante el ensayo de hemaglutinación.

Ensayo de inmunotinción. Nueve horas después de la infección por el virus de la gripe, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada fosfato (STF) y se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % (en STF) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se trataron con Triton X-100 al 0,1 % y se procesaron como describen Neumann *et al.* (1997).

Resultados

Generación de virus infecciosos mediante la expresión estimulada con el plásmido de segmentos de ARN viral, tres subunidades de polimerasa y proteína NP. Aunque la transfección de las células con una mezcla de RNPs extraídas de viriones purificados da lugar a partículas de la gripe infecciosas, es probable que esta estrategia no sea eficaz cuando se utiliza con ocho RNPs diferentes generadas *in vitro*. Para producir virus de la gripe infecciosos completamente a partir de ADNc, se generaron ocho RNPs virales *in vivo*. Por consiguiente, se prepararon plásmidos que contienen ADNc para los ARN virales de longitud completa del virus A/WSN/33, flanqueados por el promotor de la ARN polimerasa I humano y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón. En principio, la transfección de estos ocho plásmidos en células eucariotas debería dar lugar a la síntesis de los ocho ARNvs de la gripe. Las proteínas PB2, PB1, PA y NP, generadas por cotransfección de los plásmidos de expresión de proteínas, deben ensamblar entonces los ARNvs en RNPvs funcionales que se replican y transcriben, formando, en última instancia virus de la gripe infecciosos (Figura 3). Se transfectaron 1×10^6 células 293T con plásmidos de expresión de proteínas (1 μ g de pcDNA762(PB2), 1 μ g de pcDNA774(PB1), 0,1 μ g de pcDNA787(PA), 1 μ g de pCAGGS-WSN-NPO/14) y 1 μ g de cada uno de los siguientes plásmidos de la ARN polimerasa I (pPo1I-WSN-PB2, pPo1I-WSN-PB1, pPo1I-WSN-PA, pPo1I-WSN-HA, pPo1I-WSN-NP, pPo1I-WSN-NA, pPo1I-WSN-M y pPo1I-WSN-NS). La decisión de utilizar una cantidad reducida de pcDNA787(PA) se basó en observaciones previas (Mena *et al.*, 1996), y datos en condiciones óptimas para la generación de partículas similares a virus (PSV) (datos no mostrados). Se hallaron veinticuatro horas después de la transfección de células 293T, 7×10^3 ufp de virus por ml en el sobrenadante (Experimento 1, Tabla 1), lo que demuestra por vez primera la capacidad de la genética inversa para producir virus de la gripe A completamente a partir de plásmidos.

Tabla 1. Grupos de plásmidos utilizados para producir virus de la gripe a partir de ADNc clonado*

		Experimento							
Plásmidos de la ARN polimerasa I para:†		1	2	3	4	5	6	7	8
	PB1	+	+	-	-	-	-	-	-
	PR8 PB1			+	+	+	+	+	+

		Experimento							
Plásmidos de la ARN polimerasa I para:†		1	2	3	4	5	6	7	8
	PB2	+	+	+	+	+	+	+	+
	PA	+	+	+	+	+	+	+	+
	HA	+	+	+	+	+	+	+	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	+
	NA	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	+	+	+	+	+	+	+	+
	NS	+	+	+	+	+	+	+	+
Plásmidos de expresión de proteínas para:									
	PB1	+	+	+	+	+		+	+
	PB2	+	+	+	+	+	+	-	+
	PA	+	+	+	+	+	+	-	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	-
	HA	-	+	-	+	+	+	+	+
	NA	-	+	-	+	+	+	+	+
	M1	-	+	-	+	+	+	+	+
	M2	-	+	-	+	+	+	+	+
	NS2	-	+	-	+	+	+	+	+
Título del virus (ufp/ml)		7 x 103	7 x 103	1 x 103	3 x 104	0	0	0	0
*Las células 293T se transfectaron con los plásmidos indicados. Veinticuatro (Experimentos 1 y 2) o cuarenta y ocho horas (Experimentos 3-8) más tarde, se determinó el título del virus en el sobrenadante en células MDCK. † A menos que se especifique lo contrario, los plásmidos se construyeron con ADNcs que representan los ARN del virus A/WSN/33.									

Eficacia de la producción de virus de la gripe con la coexpresión de todas las proteínas estructurales virales. Aunque la expresión de las proteínas NP y polimerasa virales es suficiente para la generación estimulada por el plásmido de los virus de la gripe, era posible mejorar la eficacia. En estudios previos, la expresión de todas las proteínas estructurales del virus de la gripe (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2 y NS2) dio lugar a PSVs que contenían un ARNv artificial codificante de un gen indicador de la cloranfenicol-acetiltransferasa (Mena *et al.*, 1996). Por consiguiente, la disponibilidad de todo el complemento de proteínas estructurales, en lugar de solo aquel requerido para la replicación y la transcripción del ARN viral, podría mejorar la eficacia de la producción del virus. Con este fin, las células 293T se transfectaron con cantidades óptimas de plásmidos de expresión de proteínas virales (a juzgar por la producción de PSV; datos no publicados): 1 µg de pcDNA762(PB2) y pcDNA774(PB1); 0,1 µg de pcDNA787(PA); 1 µg de pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0/14 y pCAGGS-WNA15; 2 µg de pCAGGS-WSN-M1-2/1; 0,3 µg de pCA-NS2; y 0,03 µg de pEP24c (para M2) junto con 1 µg de cada uno de los plásmidos de la ARN polimerasa I (Experimento 2, Tabla 1). Un segundo grupo de células se transfectó con el mismo grupo de los plásmidos de la ARN polimerasa I, a excepción del gen PB1, para el que pPo1I-PR/8/34-PB1 se sustituyó en un esfuerzo por generar un virus de genoma reordenado, junto con plásmidos que expresan únicamente PA, PB1, PB2 y NP (Experimento 3, Tabla 1) o aquellos que expresan todas las proteínas estructurales de la gripe (Experimento 4, Tabla 1). Los rendimientos del virus WSN no se diferencian apreciablemente a las 24 horas (Experimentos 1 y 2, Tabla 1) o a las 36 horas (datos no mostrados) post-transfección. No obstante, se halló un aumento de más de 10 veces en los rendimientos del virus con PR/8/34-PB1 cuando se proporcionaron todas las proteínas estructurales virales de la gripe (Experimentos 3 y 4, Tabla 1). Los controles negativos, que carecían de uno de los plásmidos para la expresión de las proteínas PA, PB1, PB2, NP, no produjeron virus alguno (Experimentos 5-8, Tabla 1). Por consiguiente, dependiendo del virus generado, la expresión de todas las proteínas estructurales del virus de la gripe A mejoraron apreciablemente la eficacia del método de genética inversa.

A continuación, la cinética de la producción del virus después de la transfección de las células se determinó utilizando el grupo de plásmidos utilizados para generar un virus con el gen A/PR/8/34-PB1. En dos de los tres experimentos, el virus se detectó por primera vez a las 24 horas después de la transfección. El título medido en aquel momento, > 103 ufp/ml, había aumentado a > 106 ufp/ml a las 48 horas después de la transfección (Tabla 2).

Para estimar el porcentaje de células transfectadas con plásmidos que producían virus, las células 293T se trataron con EDTA (0,02 %) a las 24 horas después de la transfección para dispersar las células y a continuación se realizaron estudios de dilución limitantes. En este experimento, ningún virus libre se encontró en el sobrenadante del cultivo en este intervalo de tiempo. Los resultados indicaron que se generó 1 partícula de virus infecciosa de cada 103,3 células.

Tabla 2. Cinética de la producción del virus tras la transfección con plásmidos en células 293T*

Horas tras la transfección por plásmido	Títulos del virus en el sobrenadante del cultivo (upf/ml)		
	Experimento		
	1	2	3
6	0	SR	SR
12	0	SR	0
18	0	SR	0
24	0	2×10^3	6×10^3
30	SR	5×10^4	9×10^4
36	6×10^2	$> 1 \times 10^5$	7×10^5
42	SR	$> 1 \times 10^6$	5×10^6
48	8×10^4	$> 1 \times 10^6$	1×10^7
* Las células 293T se transfectaron con ocho plásmidos de la ARN polimerasa I codificantes de genes del virus A/WSN/33 a excepción del gen PB1, que se obtiene a partir del virus A/PR/8/34, y nueve plásmidos de expresión de proteínas como se describe en el texto. En diferentes intervalos de tiempo, se titularon virus en el sobrenadante del cultivo en células MDCK. SR = sin realizar.			

Recuperación del virus de la gripe que contiene el epítipo FLAG en la proteína NA. Para verificar que el nuevo sistema de genética inversa permita la introducción de mutaciones en el genoma de los virus de la gripe A, se generó un virus que contiene un epítipo FLAG (Castrucci *et al.*, 1992) en la proteína NA. Las células 293T se transfectaron con un plásmido de la ARN polimerasa I (pPo1I-WSN-NA/FL79) que contenía un ADNc codificante de tanto la proteína NA como de un epítipo FLAG en la parte inferior de la cabeza de la proteína, junto con la ARN polimerasa I y los plásmidos de expresión de la proteína requeridos. Para confirmar que el virus recuperado (PR8-WSN-FL79) expresó de hecho la proteína NA-FLAG, se llevaron a cabo ensayos de inmunotinción de las células infectadas por virus natural PR8-WSN-FL79 o A/WSN/33. Un anticuerpo monoclonal frente al epítipo FLAG detectó células infectadas por PR8-WSN-FL79, pero no aquellas infectadas por el virus natural. La recuperación del virus PR8-WSN-FL79 era tan eficaz como la de los virus naturales sin etiquetar (datos no mostrados). Estos resultados indican que el nuevo sistema de genética inversa permite introducir mutaciones en el genoma del virus de la gripe A.

Generación del virus de la gripe infeccioso que contiene mutaciones en el gen PA. Para producir virus que poseen mutaciones en el gen PA, se introdujeron dos mutaciones silenciosas creando nuevas secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción (Bsp120I en la posición 846 y PvuII en la posición 1.284 del ARNm). Previamente, no fue posible modificar este gen mediante genética inversa, debido a la falta de un sistema de selección fiable. Se recuperaron los virus transfectantes, PAT846C y PA-A1284. Los virus transfectantes recuperados se clonaron biológicamente mediante dos diluciones limitantes consecutivas. Para verificar que los virus recuperados se transfectaron de hecho con mutaciones en el gen PA, se obtuvo ADNc para el gen PA por PCR con transcriptasa inversa. Los virus PA-T846C y PA-A1284C poseían las mutaciones esperadas en el gen PA, como se demostró por la presencia de los sitios de restricción recién introducidos. PCR de las mismas muestras virales y cebadores sin la etapa de transcripción inversa no pudo producir ningún producto (datos no mostrados), lo que indica que el ADNc de PA se originó de hecho a partir del ARNv en lugar del plásmido utilizado para generar los virus. Estos resultados ilustran cómo los virus con genes mutados pueden producirse y recuperarse sin utilizar virus auxiliares.

Discusión

Los sistemas de genética inversa descritos en el presente documento permiten producir de manera eficaz virus de la gripe A completamente a partir de ADNc clonados. Bridgen y Elliott (1996) también utilizaron la genética inversa para generar un virus Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*), pero este contiene solo tres segmentos de ARN de sentido negativo, y la eficacia de su producción fue baja, 10^2 upf/ 10^7 células. Aunque los rendimientos de los virus diferían entre los experimentos, se observaron consistentemente $> 10^3$ upf/106 células para el virus de la gripe, que contiene ocho segmentos. Hay varias explicaciones para la alta eficacia del sistema de genética inversa descrito anteriormente. En lugar de producir RNPs *in vitro* (Luytjes *et al.*, 1989), se generaron RNPs *in vivo* mediante la

síntesis intracelular de ARNvs utilizando ARN polimerasa I y a través de la expresión estimulada con plásmidos de las proteínas de la polimerasa viral y NP. Asimismo, el uso de células 293T, que se transfectan fácilmente con plásmidos (Goto *et al.*, 1997), aseguró que una gran población de células recibiese todos los plásmidos necesarios para la producción del virus. Además, el gran número de transcritos producidos por la ARN polimerasa I, que se encuentra entre las enzimas expresadas más abundantemente en células en crecimiento, contribuyó probablemente a la eficacia general del sistema. Estas características se dirigieron a un número proporcionalmente abundante de transcritos de ARNv y cantidades adecuadas de la proteína viral para la encapsidación de ARNv, formación de RNPs en el núcleo, y exportación de estos complejos a la membrana celular, en la que los nuevos virus se ensamblan y se liberan.

Los sistemas de genética inversa previamente establecidos (Enami *et al.*, 1990; Neumann *et al.*, 1994; Luytjes *et al.*, 1989; Pleschka *et al.*, 1996) requieren la infección por virus auxiliar y, por lo tanto, los métodos de selección permiten que un pequeño número de transfectantes se recupere de un gran número de virus auxiliares. Dichas estrategias se han empleado para generar virus de la gripe que poseen uno de los siguientes genes obtenidos a partir de ADNc: PB2 (Subbarao *et al.*, 1993), HA (Enami *et al.*, 1991; Horimoto *et al.*, 1994), NP (Li *et al.*, 1995), NA (Enami *et al.*, 1990), M (Castrucci *et al.*, 1995; Yasuda *et al.*, 1994) y NS (Enami *et al.*, 1991). La mayoría de los métodos de selección, a excepción de los aplicables a los genes HA y NA, dependen de la temperatura de crecimiento, restricción del espectro de huésped, o sensibilidad a los fármacos, lo que limita la utilidad de la genética inversa para el análisis funcional de los productos génicos. Incluso con los genes HA y NA, para los cuales se disponen sistemas de selección estimulados por anticuerpos fiables, resulta difícil producir virus con defectos de crecimiento prominentes. En cambio, el sistema de genética inversa descrito en el presente documento no requiere virus auxiliares y permite generar transfectantes con mutaciones en cualquier segmento génico o con graves defectos de crecimiento. Al tener la tecnología para introducir cualquier mutación viable en el genoma del virus de la gripe A, los investigadores abordan una serie de cuestiones duraderas, tales como la naturaleza de las secuencias reguladoras en las regiones no traducidas del genoma viral, relaciones estructura-función de las proteínas virales, bases moleculares de la restricción del espectro del huésped y patogenicidad viral.

Aunque se disponen vacunas de la gripe inactivadas, su eficacia es subóptima debido en parte a su limitada capacidad para obtener respuestas de IgA local y linfocitos T citotóxicos. Los ensayos clínicos de vacunas de la gripe vivas adaptadas al frío puestas en marcha sugieren ahora que dichas vacunas se atenúan de manera óptima, de modo que no causarán síntomas de la gripe, aunque inducirán aún inmunidad protectora (revisado en Keitel y Piedra, 1998). No obstante, los resultados preliminares indican que estas vacunas de virus vivos no serán significativamente más eficaces que la mejor vacuna inactivada (revisado en Keitel y Piedra, 1998), dejando un margen para mejoras adicionales. Una posibilidad sería la de modificar una vacuna adaptada al frío con el sistema de genética inversa descrito anteriormente. Alternativamente, se podría empezar de cero mediante el uso de la genética inversa para producir una cepa de la gripe A "maestra" con múltiples mutaciones atenuantes en los genes que codifican proteínas internas. La aplicación más intrigante del sistema de genética inversa descrito en el presente documento puede residir en la rápida producción de vacunas de virus vivos atenuados en los casos sospechosos de pandemias que implican nuevos subtipos de HA o NA del virus de la gripe.

Este nuevo sistema de genética inversa potenciará probablemente el uso de virus de la gripe como vectores de vacuna. Los virus pueden modificarse por ingeniería genética para expresar proteínas extrañas o epítomos inmunogénicos además de las proteínas virales de la gripe. Se podría generar, por ejemplo, virus con proteínas extrañas como noveno segmento (Enami *et al.*, 1991) y utilizarlos como vacunas vivas. No solo los virus de la gripe estimulan fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células y humores, sino que también ofrecen una amplia matriz de la superficie del virión de las proteínas de NA y HA (por ejemplo, 15 subtipos de HA y 9 de NA y sus variantes epidémicas), lo que permite la inmunización repetida de la misma población diana.

Los PSV de la gripe que poseen un ARNv artificial que codifica un gen indicador se han producido por la expresión de proteínas estructurales virales y ARNv con el sistema vaccinia-polimerasa T7 (Mena *et al.*, 1996). Utilizando la genética inversa, ahora pueden generarse PSVs que contienen ARNvs que codifican las proteínas requeridas para la transcripción y replicación del ARNv (es decir, PA, PB1, PB2 y NP), así como ARNvs que codifican proteínas de interés. Dichos PSV pueden ser vehículos de administración de genes útiles. Es importante destacar que, su falta de genes codificantes de las proteínas estructurales virales podría asegurar que no se produzcan virus infecciosos después de la terapia génica con PSV. Dado que el genoma del virus de la gripe no se integra en el cromosoma huésped, el sistema de PSV sería adecuado para la terapia génica en situaciones que requieren solamente la transducción a corto plazo de células (por ejemplo, para el tratamiento contra el cáncer). En cambio, con respecto a vectores de adenovirus (Kovesdi *et al.*, 1997), los PSV de la gripe podrían contener tanto variantes de HA como NA, permitiendo el tratamiento repetido de las poblaciones diana.

La familia *Orthomyxoviridae* comprende virus de la gripe A, B y C, así como *Thogotovirus* recientemente clasificado. La estrategia para la generación de virus infecciosos de la gripe A completamente a partir de ADNc clonados descritos en el presente documento se aplicaría a cualquier ortomixovirus, y tal vez también a otros virus ARN segmentado de sentido negativo (por ejemplo, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*). La capacidad para manipular el genoma viral sin limitaciones técnicas tiene profundas repercusiones en el estudio de los ciclos de vida viral y su regulación, la función de las proteínas virales y los mecanismos moleculares de patogenicidad viral.

Ejemplo 2

Para desarrollar un sistema de genética inversa para la gripe A/Puerto Rico/8/34, el ARN viral se extrajo del fluido alantoideo de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), variante de alto crecimiento Madison (PR8HG), utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen) según el protocolo del fabricante. ADNc se sintetizó utilizando MMLV-RTase (Promega) y el cebador Uni 12. Los ADNc se amplificaron por PCR durante la noche utilizando lo siguiente:

Grupos de cebadores

- 10 PB1: Ba PB1-1 y PB1-1735R (fragmento frontal), PBL-903 y Ba-PB1-2341R (fragmento posterior)
- Ba-PB1-1 CACACACGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGCA (SEQ ID NO: 9)
 173PB1-1735R GGGTTTGTATTTGTGTGTCACC (SEQ ID NO: 10)
 233PB1-903 CCAGGACACTGAAATTTCTTTCAC (SEQ ID NO: 11) Ba-PB1-2341R
 15 CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGCATTT (SEQ ID NO: 12)
- PB2: Ba PB2-1 y B2 1260R (fragmento frontal), WSN PB2 sec-2 y Ba-PB2-2341R (fragmento posterior)
- Ba-PB2-1 CACACAGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTC (SEQ ID NO: 13)
 20 B2 1260R CACACACGTCTCCATCATAATCCTCTTG (SEQ ID NO: 14)
- WSN PB2 sec-2 CTCCTCTGATGGTGGCATAAC (SEQ ID NO: 15) Ba-PB2-2341R
 CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT (SEQ ID NO: 16)
- 25 PA:
- Bm-PA-1 CACACACGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTAC (SEQ ID NO: 17)
 Bm-PA-2233R
 CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTACTT (SEQ ID NO: 18)
- 30 HA:
- Bm-HA-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGG (SEQ ID NO: 19)
 Bm-NS-890R:
 CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID NO: 20)
- 35 NP:
- Bm-NP-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTA (SEQ ID NO: 21)
 Bm-NP-1565R
 CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT (SEQ ID NO: 22)
- 40 NA:
- Ba-NA-1: CACACAGGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO: 23)
 Ba-NA-1413R:
 CACACAGGTCTGGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT (SEQ ID NO: 24)
- 45 M:
- Bm-M-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGTAG (SEQ ID NO: 25)
 Bm-M-1027R
 CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT (SEQ ID NO: 26)
- 50 NS:
- Bm-NS-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTG (SEQ ID NO: 27)
 Bm-NS-890R
 CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID NO: 28)
- 55

ADN polimerasa: *ufp* ADN polimerasa nativa (Stratagene).

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel y se extrajeron del gel de agarosa utilizando un kit de extracción de gel (Qiagen). Los genes extraídos se ligaron en vector como pT7Blue (Novagen) utilizando un kit de ligamento ver. II Takara (Takara). Tras 5 horas, los genes vinculados se transformaron en JM109 (genes PB2, M, y NS) o DH5alfa (PA, PBL, y NP). Seis colonias de cada gen se cultivaron en TB durante 8 horas. Los plásmidos se extrajeron a partir del cultivo de bacterias, y se secuenciaron cuatro clones por gen.

Los genes PA, NP, M y NS en pT7Blue se escindieron por la enzima *Bsm* BI (New England Biolabs). El gen PB1 se escindió por *Bsa* I (New England Biolabs). Los genes escindidos se vincularon durante la noche con el vector pPo1IR que contiene el promotor de la ARN polimerasa I humano y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón

que se digirieron con *Bsm* BI. El fragmento frontal del gen PB2 en pT7Blue se escindió por *Bsr* GI (New England Biolabs) y *Bam* HI (Roche), y el fragmento posterior se escindió por *Bsr* GI (New England Biolabs) y *Spe* I (Roche). Los fragmentos escindidos se mezclan y se digieren por *Bsa* I. Tras 6 horas, los genes digeridos se purificaron utilizando un kit de purificación por PCR (Qiagen) y se vincularon durante la noche entre los sitios *Bsm* BI del vector pPo1IR.

Los genes PB1, PA, NP, M, y NS-pPo1IR vinculados se utilizaron para transformar JM109 (genes M y NS) o DH5alfa (genes PB1, PA y NP) durante la noche. Las colonias de bacterias transformadas se cultivaron en LB durante la noche. PB2-pPo1IR vinculado se utilizó para transformar JM109 durante la noche.

Los plásmidos se extrajeron de los cultivos bacterianos y los insertos génicos se confirmaron por digestión enzimática. Las colonias de bacterias transformadas por PB2-Po1IR se cultivaron en LB durante 8 horas. Los plásmidos se extrajeron entonces y el inserto génico se confirmó por digestión enzimática. Todas las construcciones pPoll se secuenciaron para asegurarse de que no contenían mutaciones no deseadas.

Las construcciones pPo1IR para PR8HG se transfectaron en células de riñón embrionario humano 293T con construcciones A/WSN/33(WSN)-HA y NA, A/Hong Kong/483/97(HK)-HAavir y NA, o A/Kawasaki/01 (Kawasaki)-HA y NA Po1I y cuatro construcciones de expresión de proteínas para las proteínas polimerasa y NP de A/WSN/33. Los sobrenadantes de las células 293T transfectadas se diluyeron en serie (sin diluir a 10^{-7}) y se infectaron en las cavidades alantoideas de huevos de pollo embrionados con 9 días de vida. Se recogieron los fluidos alantoideos de los huevos infectados y sus títulos del virus se ensayaron mediante el ensayo de HA (Tabla 3).

Tabla 3

Virus que poseen genes PR8 junto con los siguientes genes HA y NA	Título de HA (HAU/ml) de fluido alantoideo de huevos inoculados con sobrenadantes de 293T diluidos en:							
	sin diluir	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
WSN-HA NA	<1	<1	200	<1	<1	<1	<1	<1
HK-HAavir NA	100	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Kawasaki-HA NA	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Las muestras de HA positivas (virus con WSN-HA NA en 10^{-2} y virus con HK-HAavir NA sin diluir) se diluyeron en serie a partir de 10^{-2} a 10^{-8} y se infectaron 100 μ l de cada dilución en huevos de pollo embrionados. Los fluidos alantoideos de los huevos infectados se recogieron y sus títulos de virus se ensayaron por el ensayo de HA (Tabla 4). El 50 % de la dosis infecciosa del huevo (DIH_{50}) de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) preparada a partir de plásmidos era de $10^{10,33}$ /ml, y el título de HA era 1: 3200.

Se prepararon un virus recombinante con los genes HA y NA de A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) y el resto de los genes del virus de la gripe de tipo A procedente de PR8HG. El título del virus recombinante era $10^{10,67}$ DIH_{50} /ml, y el título de HA era 1:1600.

Tabla 4

Virus que poseen genes PR8 junto con los siguientes genes HA y NA	Título de HA (HAU/mJ) en cada dilución						
	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
WSN-HANA	160	40	40	320	40	640	<1
HK-HAavir NA	400	800	400	400	400	800	<1

Secuencias de genes PR8

PA

AGCGAAAGCA GGTACTGATC CAAAATGGAA GATTTTGTGC
GACAATGCTT
CAATCCGATG ATTGTCGAGC TTGCGGAAAA AACAAATGAAA
GAGTATGGGG
AGGACCTGAA AATCGAAACA AACAAATTTG CAGCAATATG
CACTCACTTG
GAAGTATGCT TCATGTATTC AGATTTTCAC TTCATCAATG
AGCAAGGCGA
GTCAATAATC GTAGAACTTG GTGATCCAAA TGCACTTTTG
AAGCACAGAT
TTGAAATAAT CGAGGGAAGA GATCGCACAA TGGCCTGGAC
AGTAGTAAAC
AGTATTTGCA ACACTACAGG GGCTGAGAAA CCAAAGTTTC
TACCAGATTT
GTATGATTAC AAGGAGAATA GATTCATCGA AATTGGAGTA
ACAAGGAGAG
AAGTTCACAT ATACTATCTG GAAAAGGCCA ATAAAATTAA
ATCTGAGAAA
ACACACATCC ACATTTTCTC GTTCACTGGG GAAGAAATGG
CCACAAAGGC
AGACTACACT CTCGATGAAG AAAGCAGGGC TAGGATCAAA
ACCAGACTAT
TCACCATAAG ACAAGAAATG GCCAGCAGAG GCCTCTGGGA
TTCCTTTCGT

CAGTCCGAGA GAGGAGAAGA GACAATTGAA GAAAGGTTTG
 AAATCACAGG
 AACAAATGCGC AAGCTTGCCG ACCAAAGTCT CCCGCCGAAC
 TTCTCCAGCC
 TTGAAAATTT TAGAGCCTAT GTGGATGGAT TCGAACCGAA
 CGGCTACATT
 GAGGGCAAGC TGTCTCAAAT GTCCAAAGAA GTAAATGCTA
 GAATTGAACC
 TTTTTTGAAA ACAACACCAC GACCACTTAG ACTTCCGAAT
 GGGCCTCCCT
 GTTCTCAGCG GTCCAAATTC CTGCTGATGG ATGCCTTAAA
 ATTAAGCATT
 GAGGACCCAA GTCATGAAGG AGAGGGAATA CCGCTATATG
 ATGCAATCAA
 ATGCATGAGA ACATTCTTTG GATGGAAGGA ACCCAATGTT
 GTTAAACCAC
 ACGAAAAGGG AATAAATCCA AATTATCTTC TGTCATGGAA
 GCAAGTACTG
 GCAGAACTGC AGGAÇATTGA GAATGAGGAG AAAATTCCAA
 AGACTAAAAA
 TATGAAGAAA ACAAGTCAGC TAAAGTGGGC ACTTGGTGAG
 AACATGGCAC
 CAGAAAAGGT AGACTTTGAC GACTGTAAAG ATGTAGGTGA
 TTTGAAGCAA
 TATGATAGTG ATGAACCAGA ATTGAGGTCG CTTGCAAGTT
 GGATTCAGAA
 TGAGTTTAAC AAGGCATGCG AACTGACAGA TTCAAGCTGG
 ATAGAGCTCG
 ATGAGATTGG AGAAGATGTG GCTCCAATTG AACACATTGC
 AAGCATGAGA
 AGGAATTATT TCACATCAGA GGTGTCTCAC TGCAGAGCCA
 CAGAATACAT
 AATGAAGGGA GTGTACATCA ATACTGCCTT GCTTAATGCA
 TCTTGTGCAG
 CAATGGATGA TTTCCAATTA ATTCCAATGA TAAGCAAGTG
 TAGAACTAAG
 GAGGGAAGGC GAAAGACCAA CTTGTATGGT TTCATCATAA
 AAGGAAGATC
 CCACTTAAGG AATGACACCG ACGTGGTAAA CTTTGTGAGC
 ATGGAGTTTT
 CTCTCACTGA CCCAAGACTT GAACCACATA AATGGGAGAA
 GTACTGTGTT
 CTTGAGATAG GAGATATGCT TATAAGAAGT GCCATAGGCC
 AGGTTTCAAG
 GCCCATGTTC TTGTATGTGA GAACAAATGG AACCTCAAAA
 ATTAAAATGA
 AATGGGGAAT GGAGATGAGG CGTTGCCTCC TCCAGTCACT
 TCAACAAATT
 GAGAGTATGA TTGAAGCTGA GTCCTCTGTC AAAGAGAAAG
 ACATGACCAA

AGAGTTCTTT GAGAACAAAT CAGAAACATG GCCCATTGGA
 GAGTCCCCCA
 AAGGAGTGGA GGAAAGTTCC ATTGGGAAGG TCTGCAGGAC
 TTTATTAGCA
 AAGTCGGTAT TCAACAGCTT GTATGCATCT CCACAACCTAG
 AAGGATTTTC
 AGCTGAATCA AGAAAACTGC TTCTTATCGT TCAGGCTCTT
 AGGGACAACC
 TGGAACCTGG GACCTTTGAT CTTGGGGGGC TATATGAAGC
 AATTGAGGAG
 TGCCTGATTA ATGATCCCTG GGTTTTGCTT AATGCTTCTT
 GGTCAACTC
 CTTCCTTACA CATGCATTGA GTTAGTTGTG GCAGTGCTAC
 TATTTGCTAT
 CCATACTGTC CAAAAAAGTA CCTTGTTTCT ACT
 (SEQ ID NO:1)

PB1

AGCGAAAGCA GGCAAACCAT TTGAATGGAT GTCAATCCGA
 CCTTACTTTT CTAAAAGTG CCAGCACAAA ATGCTATAAG
 CACAACCTTC
 CCTTATACTG GAGACCCTCC TTACAGCCAT GGGACAGGAA
 CAGGATACAC
 CATGGATACT GTCAACAGGA CACATCAGTA CTCAGAAAAG
 GGAAGATGGA
 CAACAAACAC CGAAACTGGA GCACCGCAAC TCAACCCGAT
 TGATGGGCCA
 CTGCCAGAAG ACAATGAACC AAGTGGTTAT GCCCAAACAG
 ATTGTGTATT
 GGAGGCGATG GCTTTCCTTG AGGAATCCCA TCCTGGTATT
 TTTGAAAAC
 CGTGTATTGA AACGATGGAG GTTGTTTCAGC AAACACGAGT
 AGACAAGCTG
 ACACAAGGCC GACAGACCTA TGACTGGACT CTAATAGAA
 ACCAACCTGC
 TGCAACAGCA TTGGCCAACA CAATAGAAGT GTTCAGATCA
 AATGGCCTCA
 CGGCCAATGA GTCTGGAAGG CTCATAGACT TCCTTAAGGA
 TGTAATGGAG
 TCAATGAACA AAGAAGAAAT GGGGATCACA ACTCATTTTC
 AGAGAAAGAG
 ACGGGTGAGA GACAATATGA CTAAGAAAAT GATAACACAG
 AGAACAATGG
 GTAAAAAGAA GCAGAGATTG AACAAAAGGA GTTATCTAAT
 TAGAGCATTG
 ACCCTGAACA CAATGACCAA AGATGCTGAG AGAGGGAAGC
 TAAAACGGAG
 AGCAATTGCA ACCCCAGGGA TGCAAATAAG GGGGTTTGTA
 TACTTTGTTG

AGACACTGGC AAGGAGTATA TGTGAGAAAC TTGAACAATC
 AGGGTTGCCA
 GTTGGAGGCA ATGAGAAGAA AGCAAAGTTG GCAAATGTTG
 TAAGGAAGAT
 GATGACCAAT TCTCAGGACA CCGAACTTTC TTTCACCATC
 ACTGGAGATA
 ACACCAAATG GAACGAAAAT CAGAATCCTC GGATGTTTTT
 GGCCATGATC
 ACATATATGA CCAGAAATCA GCCCGAATGG TTCAGAAATG
 TTCTAAGTAT
 TGCTCCAATA ATGTTCTCAA ACAAATGGC GAGACTGGGA
 AAAGGGTATA
 TGTTTGAGAG CAAGAGTATG AACTTAGAA CTCAAATACC
 TGCAGAAATG
 CTAGCAAGCA TCGATTGAA ATATTTCAAT GATTCAACAA
 GAAAGAAGAT
 TGAAAAAATC CGACCGCTCT TAATAGAGGG GACTGCATCA
 TTGAGCCCTG
 GAATGATGAT GGGCATGTTT AATATGTAA GCACTGTATT
 AGGCGTCTCC
 ATCCTGAATC TTGGACAAAA GAGATACACC AAGACTACTT
 ACTGGTGGGA
 TGGTCTTCAA TCCTCTGACG ATTTTGCTCT GATTGTGAAT
 GCACCCAATC
 ATGAAGGGAT TCAAGCCGGA GTCGACAGGT TTTATCGAAC
 CTGTAAGCTA
 CTTGGAATCA ATATGAGCAA GAAAAAGTCT TACATAAACA
 GAACAGGTAC
 ATTTGAATTC ACAAGTTTTT TCTATCGTTA TGGGTTTGT
 GCCAATTTCA
 GCATGGAGCT TCCCAGTTTT GGGGTGTCTG GGATCAACGA
 GTCAGCGGAC
 ATGAGTATTG GAGTTACTGT CATCAAAAAC AATATGATAA
 ACAATGATCT
 TGGTCCAGCA ACAGCTCAAA TGGCCCTTCA GTTGTTTCATC
 AAAGATTACA
 GGTACACGTA CCGATGCCAT ATAGGTGACA CACAAATACA
 AACCCGAAGA
 TCATTTGAAA TAAAGAACT GTGGGAGCAA ACCCGTTCCA
 AAGCTGGACT
 GCTGGTCTCC GACGGAGGCC CAAATTTATA CAACATTAGA
 AATCTCCACA
 TTCCTGAAGT CTGCCTAAAA TGGGAATTGA TGGATGAGGA
 TTACCAGGGG
 CGTTTATGCA ACCCACTGAA CCCATTTGTC AGCCATAAAG
 AAATTGAATC
 AATGAACAAT GCAGTGATGA TGCCAGCACA TGGTCCAGCC
 AAAAACATGG
 AGTATGATGC TGTTGCAACA ACACACTCCT GGATCCCCAA
 AAGAAATCGA

TCCATCTTGA ATACAAGTCA AAGAGGAGTA CTTGAGGATG
AACAAATGTA
CCAAAGGTGC TGCAATTTAT TTGAAAAATT CTTCCCCAGC
AGTTCATACA
GAAGACCAGT CGGGATATCC AGTATGGTGG AGGCTATGGT
TTCCAGAGCC
CGAATTGATG CACGGATTGA TTTCGAATCT GGAAGGATAA
AGAAAGAAGA
GTTCACTGAG ATCATGAAGA TCTGTTCCAC CATTGAAGAG
CTCAGACGGC
AAAAATAGTG AATTTAGCTT GTCCTTCATG AAAAAATGCC
TTGTTTCTAC
T
(SEQ ID NO:2)

PB2

AGCGAAAGCA GGTCAATTAT ATTCAATATG GAAAGAATAA
AAGAACTACG
AAATCTAATG TCGCAGTCTC GCACCCGCGA GATACTCACA
AAAACCACCG
TGGACCATAT GGCCATAATC AAGAAGTACA CATCAGGAAG
ACAGGAGAAG
AACCCAGCAC TTAGGATGAA ATGGATGATG GCAATGAAAT
ATCCAATTAC
AGCAGACAAG AGGATAACGG AAATGATTCC TGAGAGAAAT
GAGCAAGGAC
AAACTTTATG GAGTAAAATG AATGATGCCG GATCAGACCG
AGTGATGGTA
TCACCTCTGG CTGTGACATG GTGGAATAGG AATGGACCAA
TAACAAATAC
AGTTCATTAT CAAAAAATCT ACAAACCTTA TTTTGAAAGA
GTCGAAAGGC
TAAAGCATGG AACCTTTGGC CCTGTCCATT TTAGAAACCA
AGTCAAAATA
CGTCGGAGAG TTGACATAAA TCCTGGTCAT GCAGATCTCA
GTGCCAAGGA
GGCACAGGAT GTAATCATGG AAGTTGTTTT CCCTAACGAA
GTGGGAGCCA
GGATACTAAC ATCGGAATCG CAACTAACGA TAACCAAAGA
GAAGAAAGAA
GAACTCCAGG ATTGCAAAAT TTCTCCTTTG ATGGTTGCAT
ACATGTTGGA
GAGAGAACTG GTCCGCAAAA CGAGATTCCT CCCAGTGGCT
GGTGGAACAA
GCAGTGTGTA CATTGAAGTG TTGCATTGA CTCAAGGAAC
ATGCTGGGAA
CAGATGTATA CTCCAGGAGG GGAAGTGAGG AATGATGATG
TTGATCAAAG

CTTGATTATT GCTGCTAGGA ACATAGTGAG AAGAGCTGCA
 GTATCAGCAG
 ATCCACTAGC ATCTTTATTG GAGATGTGCC ACAGCACACA
 GATTGGTGGA
 ATTAGGATGG TAGACATCCT TAGGCAGAAC CCAACAGAAG
 AGCAAGCCGT
 GGATATATGC AAGGCTGCAA TGGGACTGAG AATTAGCTCA
 TCCTTCAGTT
 TTGGTGGATT CACATTTAAG AGAACAAGCG GATCATCAGT
 CAAGAGAGAG
 GAAGAGGTGC TTACGGGCAA TCTTCAAACA TTGAAGATAA
 GAGTGCATGA
 GGGATATGAA GAGTTCACAA TGGTTGGGAG AAGAGCAACA
 GCCATACTCA
 GAAAAGCAAC CAGGAGATTG ATTCAGCTGA TAGTGAGTGG
 GAGAGACGAA
 CAGTCGATTG CCGAAGCAAT AATTGTGGCC ATGGTATTTT
 CACAAGAGGA
 TTGTATGATA AAAGCAGTCA GAGGTGATCT GAATTTCGTC
 AATAGGGCGA
 ATCAACGATT GAATCCTATG CATCAACTTT TAAGACATTT
 TCAGAAGGAT
 GCGAAAGTGC TTTTCAAAA TTGGGGAGTT GAACCTATCG
 ACAATGTGAT
 GGAATGATT GGGATATTGC CCGACATGAC TCCAAGCATC
 GAGATGTCAA
 TGAGAGGAGT GAGAATCAGC AAAATGGGTG TAGATGAGTA
 CTCCAGCACG
 GAGAGGGTAG TGGTGAGCAT TGACCGTTTT TTGAGAATCC
 GGGACCAACG
 AGGAAATGTA CTAAGTCTC CCGAGGAGGT CAGTGAAACA
 CAGGGAACAG
 AGAAACTGAC AATAACTTAC TCATCGTCAA TGATGTGGGA
 GATTAATGGT
 CCTGAATCAG TGTGAGTCAA TACCTATCAA TGGATCATCA
 GAAACTGGGA
 AACTGTAAA ATTCAGTGGT CCCAGAACCC TACAATGCTA
 TACAATAAAA
 TGGAATTTGA ACCATTCAG TCTTTAGTAC CTAAGGCCAT
 TAGAGGCCAA
 TACAGTGGGT TTGTAAGAAC TCTGTTCCAA CAAATGAGGG
 ATGTGCTTGG
 GACATTTGAT ACCGCACAGA TAATAAACT TCTTCCCTTC
 GCAGCCGCTC
 CACCAAAGCA AAGTAGAATG CAGTTCTCCT CATTTACTGT
 GAATGTGAGG
 GGATCAGGAA TGAGAATACT TGTAAGGGGC AATTCTCCTG
 TATTCAACTA
 TAACAAGGCC ACGAAGAGAC TCACAGTTCT CGGAAAGGAT
 GCTGGCACTT

TAACTGAAGA CCCAGATGAA GGCACAGCTG GAGTGGAGTC
 CGCTGTTCTG
 AGGGGATTCC TCATTCTGGG CAAAGAAGAC AAGAGATATG
 GGCCAGCACT
 AAGCATCAAT GAACTGAGCA ACCTTGCGAA AGGAGAGAAG
 GCTAATGTGC
 TAATTGGGCA AGGAGACGTG GTGTTGGTAA TGAAACGGAA
 ACGGGACTCT
 AGCATACTTA CTGACAGCCA GACAGCGACC AAAAGAATTC
 GGATGGCCAT
 CAATTAGTGT CGAATAGTTT AAAAACGACC TTGTTTCTAC T
 (SEQ ID NO:3)

NP

AGCAAAAGCA GGGTAGATAA TCACTCACTG AGTGACATCA
 AAATCATGGC GTCTCAAGGC ACCAAACGAT CTTACGAACA
 GATGGAGACT
 GATGGAGAAC GCCAGAATGC CACTGAAATC AGAGCATCCG
 TCGGAAAAAT
 GATTGGTGGA ATTGGACGAT TCTACATCCA AATGTGCACC
 GAACTCAAAC
 TCAGTGATTA TGAGGGACGG TTGATCCAAA ACAGCTTAAC
 AATAGAGAGA
 ATGGTGCTCT CTGCTTTTGA CGAAAGGAGA AATAAATACC
 TTGAAGAACA
 TCCCAGTGCG GGGAAAGATC CTAAGAAAAC TGGAGGACCT
 ATATACAGGA
 GAGTAAACGG AAAGTGGATG AGAGAACTCA TCCTTTATGA
 CAAAGAAGAA
 ATAAGGCGAA TCTGGCGCCA AGCTAATAAT GGTGACGATG
 CAACGGCTGG
 TCTGACTCAC ATGATGATCT GGCATTCCAA TTTGAATGAT
 GCAACTTATC
 AGAGGACAAG AGCTCTTGTT CGCACCGGAA TGGATCCCAG
 GATGTGCTCT
 CTGATGCAAG GTTCAACTCT CCCTAGGAGG TCTGGAGCCG
 CAGGTGCTGC
 AGTCAAAGGA GTTGGAACAA TGGTGATGGA ATTGGTCAGA
 ATGATCAAAC
 GTGGGATCAA TGATCGGAAC TTCTGGAGGG GTGAGAATGG
 ACGAAAAACA
 AGAATTGCTT ATGAAAGAAT GTGCAACATT CTCAAAGGGA
 AATTTCAAAC
 TGCTGCACAA AAAGCAATGA TGGATCAAGT GAGAGAGAGC
 CGGAACCCAG
 GGAATGCTGA GTTCGAAGAT CTCACCTTTC TAGCACGGTC
 TGCACTCATA
 TTGAGAGGGT CGGTTGCTCA CAAGTCCTGC CTGCCTGCCT
 GTGTGTATGG

ACCTGCCGTA GCCAGTGGGT ACGACTTTGA AAGGGAGGGA
 TACTCTCTAG
 TCGGAATAGA CCCTTTCAGA CTGCTTCAAA ACAGCCAAGT
 GTACAGCCTA
 ATCAGACCAA ATGAGAATCC AGCACACAAG AGTCAACTGG
 TGTGGATGGC
 ATGCCATTCT GCCGCATTG AAGATCTAAG AGTATTAAGC
 TTCATCAAAG
 GGACGAAGGT GCTCCCAAGA GGGAAGCTTT CCACTAGAGG
 AGTTCAAATT
 GCTTCCAATG AAAATATGGA GACTATGGAA TCAAGTACAC
 TTGAACTGAG
 AAGCAGGTAC TGGGCCATAA GGACCAGAAG TGGAGGAAAC
 ACCAATCAAC
 AGAGGGCATC TGCGGGCCAA ATCAGCATAAC AACCTACGTT
 CTCAGTACAG
 AGAAATCTCC CTTTGTGACAG AACAACCATT ATGGCAGCAT
 TCAATGGGAA
 TACAGAGGGG AGAACATCTG ACATGAGGAC CGAAATCATA
 AGGATGATGG
 AAAGTGCAAG ACCAGAAGAT GTGTCTTTCC AGGGGCGGGG
 AGTCTTCGAG
 CTCTCGGACG AAAAGGCAGC GAGCCCGATC GTGCCTTCCT
 TTGACATGAG
 TAATGAAGGA TCTTATTCT TCGGAGACAA TGCAGAGGAG
 TACGACAATT
 AAAGAAAAAT ACCCTTGTTT CTACT
 (SEQ ID NO:4)

M

AGCAAAAGCA GGTAGATATT GAAAGATGAG TCTTCTAACC
 GAGGTCGAAA
 CGTACGTACT CTCTATCATC CCGTCAGGCC CCCTCAAAGC
 CGAGATCGCA
 CAGAGACTTG AAGATGTCTT TGCAGGGAAG AACACCGATC
 TTGAGGTTCT
 CATGGAATGG CTAAAGACAA GACCAATCCT GTCACCTCTG
 ACTAAGGGGA
 TTTTAGGATT TGTGTTACAG CTCACCGTGC CCAGTGAGCG
 AGGACTGCAG
 CGTAGACGCT TTGTCCAAAA TGCCCTTAAT GGGAACGGGG
 ATCCAAATAA
 CATGGACAAA GCAGTTAAAC TGTATAGGAA GCTCAAGAGG
 GAGATAACAT
 TCCATGGGGC CAAAGAAATC TCACTCAGTT ATTCTGCTGG
 TGCACTTGCC
 AGTTGTATGG GCCTCATATA CAACAGGATG GGGGCTGTGA
 CCACTGAAGT
 GGCATTTGGC CTGGTATGTG CAACCTGTGA ACAGATTGCT
 GACTCCCAGC

ATCGGTCTCA TAGGCAAATG GTGACAACAA CCAATCCACT
AATCAGACAT
GAGAACAGAA TGGTTTTAGC CAGCACTACA GCTAAGGCTA
TGGAGCAAAT
GGCTGGATCG AGTGAGCAAG CAGCAGAGGC CATGGAGGT
GCTAGTCAGG
CTAGACAAAT GGTGCAAGCG ATGAGAACCA TTGGGACTCA
TCCTAGCTCC
AGTGCTGGTC TGAAAAATGA TCTTCTTGAA AATTTGCAGG
CCTATCAGAA
ACGAATGGGG GTGCAGATGC AACGGTTCAA GTGATCCTCT
CACTATTGCC
GCAAATATCA TTGGGATCTT GCACTTGACA TTGTGGATT
TTGATCGTCT
TTTTTTCAA TGCATTTACC GTCGCTTTAA ATACGGACTG
AAAGGAGGGC
CTTCTACGGA AGGAGTGCCA AAGTCTATGA GGGAAGAATA
TCGAAAGGAA
CAGCAGAGTG CTGTGGATGC TGACGATGGT CATTTTGTCA
GCATAGAGCT
GGAGTAAAAA ACTACCTTGT TTCTACT
(SEQ ID NO:5)

NS

AGCAAAAGCA GGGTGACAAA AACATAATGG ATCCAAACAC
TGTGTCAAGC
TTTCAGGTAG ATTGCTTTCT TTGGCATGTC CGCAAACGAG
TTGCAGACCA
AGAACTAGGC GATGCCCCAT TCCTTGATCG GCTTCGCCGA
GATCAGAAAT
CCCTAAGAGG AAGGGGCAGT ACTCTCGGTC TGGACATCAA
GACAGCCACA
CGTGCTGGAA AGCAGATAGT GGAGCGGATT CTGAAAGAAG
AATCCGATGA
GGCACTTAAA ATGACCATGG CCTCTGTACC TCGGTCGCGT
TACCTAACTG
ACATGACTCT TGAGGAAATG TCAAGGGACT GGTCCATGCT
CATACCCAAG
CAGAAAGTGG CAGGCCCTCT TTGTATCAGA ATGGACCAGG
CGATCATGGA
TAAGAACATC AACTGAAAG CGAACTTCAG TGTGATTTTT
GACCGGCTGG
AGACTCTAAT ATTGCTAAGG GCTTTCACCG AAGAGGGAGC
AATTGTTGGC
GAAATTTTAC CATTGCCTTC TCTTCCAGGA CATACTGCTG
AGGATGTCAA
AAATGCAGTT GGAGTCCTCA TCGGAGGACT TGAATGGAAT
GATAACACAG
TTCGAGTCTC TGAAACTCTA CAGAGATTCG CTTGGAGAAG
CAGTAATGAG

AATGGGAGAC CTCCACTCAC TCCAAAACAG AAACGAGAAA
TGGCGGGAAC
AATTAGGTCA GAAGTTTGAA GAAATAAGAT GGTTGATTGA
AGAAGTGAGA
CACAACTGA AGATAACAGA GAATAGTTTT GAGCAAATAA
CATTTATGCA
AGCCTTACAT CTATTGCTTG AAGTGGAGCA AGAGATAAGA
ACTTTCTCGT
TTCAGCTTAT TTAGTACTAA AAAACACCCT TGTTTCTACT
(SEQ ID NO:6)

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAAATGAAGGCAAACCT
ACTGGTCCTGTTATGTGCACTTGCAGCTGCAGAT
GCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAATTCAACCGACAC
TGTTGACACAGTACTCGAGAAGAATGTGACAGT
GACACACTCTGTAAACCTGCTCGAAGACAGCCACAACGGAAAACCTAT
GTAGATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGG
GGAAATGTAACATCGCCGGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAATGCGAC
CCACTGCTTCCAGTGAGATCATGGTCCTACATT
GTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTT
CATCGACTATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTGAG
CTCAGTGTTCATTCGAAAGATTCGAAATATTTCCCAAAGAAAGCT
CATGGCCCAACCACAACACAAACGGAGTAACGG
CAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTA
TGGCTGACGGAGAAGGAGGGCTCATACCCAAAG
CTGAAAAATTCTTATGTGAACAAAAAAGGGAAAGAAGTCCTTGTACT
GTGGGGTATTCATCACCCGCCTAACAGTAAGGA
ACAACAGAATCTCTATCAGAATGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGA
CTTCAAATTATAACAGGAGATTTACCCCGGAAA
TAGCAGAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTA
TACTGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATA
ATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCACCAATGTATGCTTTTCGC
ACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATCAC
CTCAAACGCATCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGTCAAACACCCC
TGGGAGCTATAAACAGCAGTCTCCCTTACCAGA
ATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAATACGTCAGGAGT
GCCAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGGAAC
ATTCCGTCCATTCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCCGGTTTT
ATTGAAGGGGGATGGACTGGAATGATAGATGG
ATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAG
CGGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAACG
GGATTACAAACAAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAATGAACATTCAA
TTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAAATTA
GAAAAAAGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTTCT
GGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTAGT
TCTACTGGAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCCATGACTCAAATGTGA
AGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAA
AGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCTACCAC
AAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGTAAGA

AATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAA
 CAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAAATTGGAATC
 AATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTC
 ACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCA
 GTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCT
 GAGATTAGAATTTTCAGAGATATGAGGAAAAAC
 ACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:7)

NA

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC
 CATTGGATCAATCTGTCTGGTAGTCGGACTAATT
 AGCCTAATATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCA
 TTCAATTCAAACCTGGAAGTCAAAACCATACTGG
 AATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAAAATAGCACCTGGGTAA
 AGGACACAACCTTCAGTGATATTAACCGGCAATT
 CATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAAT
 AGCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTT
 GTCATAAGAGAGCCCTTTATTTTCATGTTCTCACTTGGAATGCAGGACC
 TTTTTTCTGACCCAAGGTGCCTTACTGAATGA
 CAAGCATTCAAGTGGGACTGTAAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCT
 TAATGAGCTGCCCTGTCGGTGAAGCTCCGTCCC
 CGTACAATTCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTC
 ATGATGGCATGGGCTGGCTAACCAATCGGAATT
 TCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTAAAATACAACGGCAT
 AATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAA
 AATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAAATGGTTCAT
 GTTTTACTATAATGACTGATGGCCCGAGTGATG
 GGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACT
 AAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCTCAC
 TATGAGGAATGTTCTGTACCCTGATACCGGCAAAGTGATGTGTGT
 GTGCAGAGACAATTGGCATGGTTTGAACCGGCC
 ATGGGTGTCTTTCGATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCT
 GCAGTGGGGTTTTTCGGTGACAACCCGCGTCCCG
 AAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGATGTTGATGGAGCAAAC
 GGAGTAAAGGGATTTTCATATAGGTATGGTAAT
 GGTGTTTGGATAGGAAGGACCAAAAGTCACAGTTCCAGACATGGGTT
 TGAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGA
 GACTGATAGTAAGTTCTCTGTGAGGCAAGATGTTGTGGCAATGACTG
 ATTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAAC
 ATCCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTT
 GAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAACA
 ATCTGGACTAGTGCGAGCAGCATTCTTTTTGTGGCGTGAATAGTGAT
 ACTGTAGATTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGA
 GTTGCCATTGAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAAACTCCTTGTTT
 CTACT (SEQ ID NO:8)

5 Ejemplo 3

El virus de la gripe A/Hong Kong/213/2003 (H5N1, HK213) se replica sistémicamente en pollos, causando la infección letal. Es más, este virus es letal en embriones de pollo. Por consiguiente, a pesar de que sus proteínas de superficie se relacionan altamente con los virus de la gripe aviar patógenos circulantes actualmente, HK213 no puede utilizarse como una cepa de vacuna como intento de crecimiento en huevos de pollo embrionados, lo que origina la producción de fluido alantoideo de mala calidad. Adicionalmente, el uso de este virus altamente virulento en la producción de vacunas no es seguro para los trabajadores de la vacuna. Para ensayar la viabilidad del uso de

A/PR/8/34 como cepa de vacuna maestra, el sitio de escisión del gen de la hemaglutinina (HA) de HK213 (que contiene múltiples aminoácidos básicos) se mutó a partir de un fenotipo virulento a avirulento (de RERRRKKR (SEQ ID NO: 9) a ----TETR). Un virus que contiene el gen HA mutado produjo infección localizada no letal en pollos. Adicionalmente, el virus mutado era no letal en embriones de pollo. Por consiguiente, el crecimiento del virus mutado en huevos embrionados produjo fluido alantoideo de alta calidad, y en esta forma atenuada, el virus es seguro para los productores de vacunas.

Un virus recombinante que contiene los genes de neuraminidasa (NA) y HA mutada de HK213, y todos los genes restantes del virus de título alto A/PR/8/34 (H1N1, HG-PR8) (Ejemplo 2), que crece 10 veces mejor que otras cepas A/PR/8/34 PR8 en huevos (10^{10} DIH₅₀/ml; título HA: 1:8.000), se generó en huevos de pollo embrionados. Este virus recombinante, que expresa proteínas de superficie relacionadas con los virus de la gripe aviar patógenos circulantes actualmente, creció hasta títulos elevados en huevos de pollo embrionados (Figura 4). Por consiguiente, la sustitución de los genes HA y NA de HG-PR8 con los de una cepa actualmente circulante del virus de la gripe originó una cepa de vacuna que puede producirse de forma segura, y demuestra el uso de PR8-HG como una cepa de vacuna maestra.

Referencias

- Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, Ltd., Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1987).
- Aymard-Henry et al., *Virology: A Practical Approach*, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150 (1985).
- Bachmeyer, *Intervirology*, 5:260 (1975).
- Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16ª edición, Merck & Co., Rahway, NJ (1992).
- Bridgen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 93:15400 (1996).
- Castrucci et al., *J. Virol.*, 66:4647 (1992).
- Castrucci et al., *J. Virol.*, 69:2725 (1995).
- Conzelmann et al., *J. Gen. Virol.*, 77:381 (1996).
- Conzelmann et al., *Trends Microbiol.*, 4:386 (1996).
- Conzelmann, *Annu. Rev. Genet.*, 32:123 (1998).
- Cozelmann et al., *J. Virol.*, 68:713 (1994).
- Edwards, *J. Infect. Dis.*, 169: 68 (1994).
- Enami et al., *J. Virol.*, 65:2711 (1991).
- Enami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 87:3802 (1990).
- Enami et al., *Virology*, 185:291 (1991).
- Fodor et al., *J. Virol.*, 73:9679 (1999).
- Goto et al., *Virology*, 238:265 (1997).
- Grand y Skehel, *Nature, New Biology*, 238:145 (1972).
- Hatta et al., *Science*, 293:1840 (2001).
- Horimoto et al., *J. Virol.*, 68:3120 (1994).
- Huddleston et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:1029 (1982).
- Keitel et al., in *Textbook of Influenza*, eds. Nickolson, K. G., Webster, R. G., y Hay, A. (Blackwell, Oxford), págs. 373-390 (1998).
- Kendal et al., *Infect. Immunity*, 29:966 (1980).
- Kilbourne, *Bull. M2 Organización mundial de la Salud.*, 41: 653 (1969).
- Kovesdi et al., *J. Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:583 (1997).
- Laver & Webster, *Virology*, 69:511 (1976).
- Lawson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 92:4477 (1995).
- Li et al., *Virus Res.*, 37:153 (1995).
- Luytjes et al., *Cell*, 59:1107 (1989).
- Marriott et al., *Adv. Virus Res.*, 53:321 (1999).
- Mena et al., *J. Virol.*, 70:5016 (1996).
- Mizrahi, (ed.), *Viral Vaccines*, Wiley-Liss, Nueva York, 39-67 (1990).
- Murphy, *Infect. Dis. Clin. Pract.*, 2: 174 (1993).
- Muster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 88: 5177 (1991).
- Munoz et al., *Antiviral Res.*, 46:91 (2000).
- Nagai et al., *Microbiol. Immunol.*, 43:613 (1999).
- Nagai, *Rev. Med. Virol.*, 9:83 (1999).
- Neumann et al., *Adv. Virus Res.*, 53:265 (1999).
- Neumann et al., *J. Gen. Virol.*, 83:2635 (2002).
- Neumann et al., *J. Virol.*, 71:9690 (1997).
- Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 96:9345 (1999).
- Neumann et al., *Virology*, 202:477 (1994).
- Neumann et al., *Virology*, 287:243 (2001).
- Niwa et al., *Gene*, 108:193 (1991).
- Ogra et al., *J. Infect. Dis.*, 134: 499 (1977).
- Osol (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).

Parks *et al.*, *J. Virol.*, 73:3560 (1999).
 Pekosz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 96:8804 (1999).
 Perez *et al.*, *Virology*, 249:52 (1998).
 Pleschka *et al.*, *J. Virol.*, 70:4188 (1996).
 5 Radecke *et al.*, *EMBO J.*, 14:5773 (1995).
 Roberts *et al.*, *Virology*, 247:1 (1998).
 Robertson *et al.*, *Biologicals*, 20:213 (1992).
 Robertson *et al.*, *Giornale di Igiene e Medicina Preventiva*, 29:4 (1988).
 Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 93:14998 (1996).
 10 Schnell *et al.*, *EMBO J.*, 13:4195 (1994).
 Subbarao *et al.*, *J. Virol.*, 67:7223 (1993).
 Organización Mundial de la Salud TSR n.º 673 (1982).

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Kawaoka, Yoshihiro
 <120> Virus de la gripe recombinantes a título elevado para vacunas y terapia génica
 20 <130> 800.038WO1
 <150> US 60/473.798
 <151> 28-05-2003
 25 <160> 40
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 30 <210> 1
 <211> 2233
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe
 35 <400> 1

ES 2 593 082 T3

```

agcgaaagca ggtactgata caaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg      60
attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca      120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc agattttcac      180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa tgcacttttg      240
aagcacagat ttgaaataat cgagggaaga gatcgacaaa tggcctggac agtagtaaac      300
agtattttgca aactacaggg ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt gtatgattac      360
aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg      420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcactggg      480
gaagaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgatgaag aaagcagggc taggatcaaa      540
accagactat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga ttctttctgt      600
cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aaatcacagg aacaatgcgc      660
aagcttgccg accaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat      720
gtggatggat tcgaaccgaa cggctacatt gagggcaagc tgtctcaaat gtccaaagaa      780
gtaaatgcta gaattgaacc ttttttgaaa acaacaccac gaccacttag acttccgaat      840
gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaaa attaagcatt      900
gaggacccaa gtcatgaagg agagggaata ccgctatatg atgcaatcaa atgcatgaga      960
acattctttg gatggaagga acccaatgtt gttaaaccac acgaaaaggg aataaatcca      1020
aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag      1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa acaagtcagc taaagtgggc acttggtgag      1140
aacatggcac cagaaaaggt agactttgac gactgtaaaag atgtaggtga tttgaagcaa      1200

tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg cttgcaagtt ggattcagaa tgagtttaac      1260
aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg atagagctcg atgagattgg agaagatgtg      1320
gctccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac      1380
tgcagagcca cagaatacat aatgaaggga gtgtacatca atactgcctt gcttaatgca      1440
tcttgtgcag caatggatga ttccaatta attccaatga taagcaagtg tagaactaag      1500
gagggaaggc gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aaggaagatc ccacttaagg      1560
aatgacaccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga cccaagactt      1620
gaaccacata aatgggagaa gtactgtgtt cttgagatag gagatatgct tataagaagt      1680
gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgtga gaacaaatgg aacctcaaaa      1740
attaaaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgctctc tccagtcact tcaacaaatt      1800
gagagtatga ttgaagctga gtcctctgtc aaagagaaag acatgaccaa agagttcttt      1860
gagaacaaat cagaaacatg gccatttga gagtccccca aaggagtggg ggaaagttcc      1920
attgggaagg tctgcaggac tttattagca aagtcggtat tcaacagctt gtatgcatct      1980
ccacaactag aaggattttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt tcaggctctt      2040
agggacaacc tggaaacctg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc aattgaggag      2100
tgccatgatta atgatccctg ggttttgctt aatgcttctt ggttcaactc ctcccttaca      2160
catgcattga gttagtgtg gcagtgtac tatttgctat ccatactgtc caaaaaagta      2220
ccttgtttct act                                     2233

```

<210> 2

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 2

agcgaaagca	ggcaaaccat	ttgaatggat	gtcaatccga	ccttactttt	ottaaaagt	60
ccagcacaaa	atgctataag	cacaactttc	ccttatactg	gagaccctcc	ttacagccat	120
gggacaggaa	caggatacac	catggatact	gtcaacagga	caatcatcagta	ctcagaaaaag	180
ggaagatgga	caacaaacac	cgaaactgga	gcaccgcaac	tcaacccgat	tgatgggcca	240
ctgccagaag	acaatgaacc	aagtggttat	gcccacacag	attgtgtatt	ggaggcgatg	300
gctttccttg	aggaatccca	tcctgggtatt	tttgaaaact	cgtgtattga	aacgatggag	360
gttgttcagc	aaacacgagt	agacaagctg	acacaaggcc	gacagacctt	tgactggact	420
ctaaatagaa	accaacctgc	tgcaacagca	ttggccaaca	caatagaagt	gttcagatca	480
aatggcctca	cggccaatga	gtctggaagg	ctcatagact	tccttaagga	tgtaatggag	540
tcaatgaaca	aagaagaaat	ggggatcaca	actcattttc	agagaaagag	acgggtgaga	600
gacaatatga	ctaagaaaat	gataacacag	agaacaatgg	gtaaaaagaa	gcagagattg	660
aacaaaagga	gttatctaata	tagagcattg	accctgaaca	caatgaccaa	agatgctgag	720
agagggaagc	taaaacggag	agcaattgca	accccaggga	tgcaataaag	ggggtttcta	780
tactttgttg	agacactggc	aaggagtata	tgtgagaaac	ttgaacaatc	agggttgcca	840
gttgagggca	atgagaagaa	agcaaagttg	gcaaatgttg	taaggaagat	gatgaccaat	900
tctcaggaca	ccgaactttc	tttcaccatc	actggagata	acaccaaagt	gaacgaaaat	960
cagaatcctc	ggatgttttt	ggccatgatc	acatatatga	ccagaaatca	gcccgaatgg	1020
ttcagaaatg	ttctaagtat	tgctocaata	atgttctcaa	acaaaatggc	gagactggga	1080
aaagggtata	tgtttgagag	caagagtatg	aaacttagaa	ctcaaatacc	tgcaagaaatg	1140
ctagcaagca	tcgatttgaa	atattttcaat	gattcaacaa	gaaagaagat	tgaaaaaatc	1200
cgaccgctct	taatagaggg	gactgcatca	ttgagccctg	gaatgatgat	gggcatgttc	1260
aatatgttaa	gcactgtatt	aggcgtctcc	atcctgaatc	ttggacaaaa	gagatacacc	1320
aagactactt	actggtggga	tggtcttcaa	tcctctgacg	attttgctct	gattgtgaat	1380
gcaccaaatc	atgaagggat	tcaagccgga	gtcgacaggt	tttatcgaac	ctgtaagcta	1440
cttggaatca	atatgagcaa	gaaaaagtct	tacataaaca	gaacagggtac	atttgaattc	1500
acaagttttt	tctatcgtaa	tgggtttgtt	gccaatttca	gcattggagct	tcccagtttt	1560
ggggtgtctg	ggatcaacga	gtcagcggac	atgagtattg	gagttactgt	catcaaaaac	1620
aatatgataa	acaatgatct	tgggtccagca	acagctcaaa	tggcccttca	gttgttcatc	1680
aaagattaca	ggtacacgta	ccgatgccat	atagggtgaca	cacaaataca	aacccgaaga	1740
tcatttgaaa	taaagaaact	gtgggagcaa	acccgttcca	aagctggact	gctggtctcc	1800
gacggaggcc	caaattttata	caacattaga	aatctccaca	ttcctgaagt	ctgcctaaaa	1860
tgggaattga	tggatgagga	ttaccagggg	cgtttatgca	acccactgaa	cccatttgtc	1920
agccataaag	aaattgaatc	aatgaacaat	gcagtgtatga	tgccagcaca	tggtccagcc	1980
aaaaacatgg	agtatgatgc	tggtgcaaca	acacactcct	ggatcccca	aagaaatcga	2040
tccatcttga	atacaagtca	aagaggagta	cttgaggatg	aacaaatgta	ccaaagggtgc	2100
tgcaatttat	ttgaaaaatt	cttccccagc	agttcataca	gaagaccagt	cgggatatcc	2160
agtatggtgg	aggctatggt	ttccagagcc	cgaattgatg	cacggattga	tttcgaatct	2220
ggaaggataa	agaaagaaga	gttcactgag	atcatgaaga	tctgttccac	cattgaagag	2280
ctcagacggc	aaaaatagtg	aatttagctt	gtccttcctg	aaaaaatgcc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 3
 <211> 2341
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 3

agcgaaagca ggtcaattat attcaatatg gaaagaataa aagaactacg aaatctaattg	60
tcgcagtcct gcacccgcga gatactcaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccacagcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aaatgattcc tgagagaaat	240
gagcaaggac aaactttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtcatggta	300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggacca taacaaatac agttcattat	360
ccaaaaatct acaaaactta ttttgaaaga gtcgaaaggc taaagcatgg aacctttggc	420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcggagag ttgacataaa tcctggtcac	480
gcagatctca gtgccaaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgtttt ccctaacgaa	540
gtggggagcca ggataactaac atcggaaatcg caactaacga taaccaaaga gaagaaagaa	600
gaactccagg attgcaaaat ttctcctttg atgggttgcac acatgttgga gagagaactg	660
gtccgcaaaa cgagattcct cccagtggct ggtggaacaa gcagtgtgta cattgaagtg	720
ttgcatttga ctcaagggaac atgctgggaa cagatgtata ctccaggagg ggaagtggag	780
aatgatgatg ttgatcaaaag cttgattatt gctgctagga acatagttag aagagctgca	840
gtatcagcag atccactagc atctttattg gagatgtgcc acagcacaca gattggtgga	900
attaggatgg tagacatcct taggcagaac ccaacagaag agcaagccgt ggatatatgc	960
aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tccttcagtt ttggtggatt cacatttaag	1020
agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagaggtgc ttacgggcaa tcttcaaa	1080
ttgaagataa gagtgcacga gggatatgaa gagttcaca tgggtgggag aagagcaaca	1140
gccatactca gaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg gagagacgaa	1200
cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atgggtatttt cacaagagga ttgtatgata	1260
aaagcagtcg gaggtgatct gaatttcgtc aataggggcg atcaacgatt gaatcctatg	1320
catcaacttt taagacattt tcagaaggat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggagtt	1380
gaacctatcg acaatgtgat gggaaatgatt gggatatgtc ccgacatgac tccaagcatc	1440
gagatgtcaa tgagaggagt gagaatcagc aaaatgggtg tagatgagta ctccagcacg	1500
gagagggtag tggtagcat tgaccgtttt ttgagaatcc gggaccaacg aggaaatgta	1560
ctactgtctc ccgaggaggc cagtgaacaa cagggaacag agaaactgac aataacttac	1620
tcacgtcaca tgatgtggga gattaatggt cctgaatcag tgttgggtcaa tacctatcaa	1680
tggatcatca gaaactggga aactgttaaa attcagtggt cccagaaccc tacaatgcta	1740
tacaataaaa tggaaatttga accatttcag tcttttagtac ctaaggccat tagaggccaa	1800
tacagtgggt ttgtaagaac tctgttccaa caaatgaggg atgtgcttgg gacatttgat	1860
accgcacaga taataaaact tcttcccttc gcagccgctc caccaaagca aagtagaatg	1920
cagttctcct catttactgt gaatgtgagg ggatcaggaa tgagaatact tgtaaggggc	1980
aattctcctg tattcaacta taacaaggcc acgaagagac tcacagttct cggaaaggat	2040
gctggcactt taactgaaga cccagatgaa ggcacagctg gagtggagtc cgctgttctg	2100
aggggattcc tcattctggg caaagaagac aagagatatg ggccagcact aagcatcaat	2160
gaactgagca accttgcgaa aggagagaag gctaattgtgc taattgggca aggagacgtg	2220
gtgttggtaa tgaaacggaa acgggactct agcatactta ctgacagcca gacagcgacc	2280
aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac	2340
t	2341

<210> 4
 <211> 1565
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 4

5

10

ES 2 593 082 T3

```

agcaaaagca gggtagataa tcactcactg agtgacatca aaatcatggc gtctcaaggc      60
accaaacgat cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc      120
agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcacc      180
gaactcaaac tcagtgatta tgagggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga      240
atggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc ttgaagaaca tcccagtgcg      300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg      360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat      420

ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcattccaa tttgaatgat      480
gcaacttata agaggacaag agctcttggt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct      540
ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga      600
gttgaacaaa tggatgatga attggtcaga atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac      660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt      720
ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc      780
cggaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctcaactttc tagcacggtc tgcactcata      840
ttgagagggt cggttgctca caagtctgc ctgctgcct gtgtgtatgg acctgccgta      900
gccagtgggt acgactttga aaggagggga tactctctag tcggaataga ccctttcaga      960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag     1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgatttgg aagatctaag agtattaagc     1080
ttcatcaaag ggacgaaggt gctcccaaga gggaaagctt cactagagg agttcaaatt     1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtac     1200
tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agaggggcatc tgcggggccaa     1260
atcagcatac aacctacgtt ctcatgacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccatt     1320
atggcagcat tcaatgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaatcata     1380
aggatgatgg aaagtgcgaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag     1440
ctctcggaag aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttctc ttgacatgag taatgaagga     1500
tcttatttct tcggagacaa tgcagaggag tacgacaatt aaagaaaaat accttgtttt     1560
ctact                                             1565

```

<210> 5
 <211> 1027
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 5

```

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact      60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt      120
tgcagggaag aacacdgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct      180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccctgct ccagtgcgag      240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcctttaat gggaacgggg atccaaataa      300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc      360
caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttggc agttgtatgg gcctcatata      420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga      480
acagattgct gactcccagc atcgggtctc taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact      540
aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat      600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtccag ctagacaaat      660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga      720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa      780
gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcaattgaca ttgtggattc      840
ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc      900

```

ES 2 593 082 T3

cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg 960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020
ttctact 1027

<210> 6
<211> 890
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

<400> 6

agcaaaagca ggggtgacaaa aacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag 60
attgctttct ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggc gatgccccat 120
tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagt actctcggtc 180
tggacatcaa gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag 240
aatccgatga ggcacttaaa atgaccatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaactg 300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggact ggtccatgct catacccaag cagaaagtgg 360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgga taagaacatc atactgaaag 420
cgaacttcag tgtgattttt gaccggctgg agactcta attgctaagg gctttcaccg 480
aagagggagc aattgttggc gaaatttcac cattgccttc tcttccagga catactgctg 540
aggatgtcaa aaatgcagtt ggagtctca tcggaggact tgaatggaat gataacacag 600
ttcgagtctc tgaaactcta cagagattcg cttggagaag cagtaatgag aatgggagac 660
ctccactcac tccaaaacag aaacgagaaa tggcgggaac aattaggtca gaagtttgaa 720
gaaataagat ggttgattga agaagtgaga cacaaactga agataacaga gaatagtttt 780
gagcaataa catttatgca agccttacat ctattgcttg aagtggagca agagataaga 840
actttctcgt ttcagcttat ttagtactaa aaaacacct tgtttctact 890

<210> 7
<211> 1775
<212> ADN
<213> Virus de la gripe

<400> 7

agcaaaagca ggggaaaata aaaacaacca aatgaaggc aaacctactg gtcctgttat 60
gtgcacttgc agctgcagat gcagacacaa tatgtatagg ctaccatgcg aacaattcaa 120
ccgacactgt tgacacagta ctcgagaaga atgtgacagt gacacactct gttaacctgc 180
tcgaagacag ccacaacgga aaactatgta gattaaaagg aatagcccca ctacaattgg 240
ggaaatgtaa catcgccgga tggctcttgg gaaaccaga atgcgacca ctgcttccag 300
tgagatcatg gtctacatt gtagaaacac caaactctga gaatggaata tgttatccag 360
gagatttcat cgactatgag gagctgaggg agcaattgag ctcagtgtca tcattcgaaa 420
gattcgaaat atttccaaa gaaagctcat ggcccaacca caacacaaac ggagtaacgg 480
cagcatgtc ccatgagggg aaaagcagtt ttacagaaa ttgctatgg ctgacggaga 540
aggagggctc atacccaaag ctgaaaaatt cttatgtgaa caaaaaggg aaagaagtcc 600

ttgtactgtg	gggtattcat	cacccgccta	acagtaagga	acaacagaat	ctctatcaga	660
atgaaaatgc	ttatgtctct	gtagtgactt	caaattataa	caggagattt	accccgaaa	720
tagcagaaag	acccaaagta	agagatcaag	ctgggaggat	gaactattac	tggaccttgc	780
taaaacccgg	agacacaata	atatTTtgagg	caaattgaaa	tctaatagca	ccaatgtatg	840
ctttcgcact	gagtagaggc	tttgggtccg	gcatcatcac	ctcaaacgca	tcaatgcatg	900
agtgtaacac	gaagtgtcaa	acacccttgg	gagctataaa	cagcagtctc	ccttaccaga	960
atatacacc	agtcacaata	ggagagtgcc	caaaatacgt	caggagtgcc	aaattgagga	1020
tggttacagg	actaaggaac	attccgtcca	ttcaatccag	aggtctatTT	ggagccattg	1080
ccggTTTTat	tgaaggggga	tggactggaa	tgatagatgg	atggtatggT	tatcatcatc	1140
agaatgaaca	gggatcaggc	tatgcagcgg	atcaaaaaag	cacacaaaat	gccattaacg	1200
ggattacaaa	caaggtgaac	actgttatcg	agaaaatgaa	cattcaattc	acagctgtgg	1260
gtaaagaatt	caacaaatta	gaaaaaagga	tggaaaattt	aaataaaaaa	gttgatgatg	1320
gatttctgga	catttggaac	tataatgcag	aattgttagt	tctactggaa	aatgaaagga	1380
ctctggattt	ccatgactca	aatgtgaaga	atctgtatga	gaaagtaaaa	agccaattaa	1440
agaataatgc	caaagaaatc	ggaaatggat	gttttgagtt	ctaccacaag	tgtgacaatg	1500
aatgcatgga	aagtgtgaag	aatgggactt	atgattatcc	caaattattc	gaagagtcaa	1560
agttgaacag	ggaaaaggta	gatggagtga	aattggaatc	aatggggatc	tatcagattc	1620
tggcgatcta	ctcaactgtc	gccagttcac	tgggtgcttt	ggtctccctg	ggggcaatca	1680
gtttctggat	gtgttctaata	ggatctttgc	agtgcagaat	atgcatctga	gattagaatt	1740
tcagagatat	gaggaaaaac	acccttgttt	ctact			1775

<210> 8

<211> 1413

<212> ADN

<213> Virus de la gripe

<400> 8

agcaaaagca	ggggTTTTaa	atgaatccaa	atcagaaaat	aataaccatt	ggatcaatct	60
gtctggtagt	cggaactaatt	agcctaatat	tgcaaatagg	gaatataatc	tcaatatgga	120
tttagccattc	aattcaaact	ggaagtcaaa	accatactgg	aatatgcaac	caaaacatca	180
ttacctataa	aaatagcacc	tgggtaaagg	acacaacttc	agtgatatta	accggcaatt	240
catctctttg	tcccatccgt	gggtgggcta	tatacagcaa	agacaatagc	ataagaattg	300
gttccaaagg	agacgttttt	gtcataagag	agccctttat	ttcatgttct	cacttgggaat	360
gcaggacctt	ttttctgacc	caaggtgcct	tactgaatga	caagcattca	agtgggactg	420
tttaaggacag	aagcccttat	agggccttaa	tgagctgccc	tgtcggtgaa	gctccgtccc	480
cgtacaattc	aagatttgaa	tcggttgctt	ggtcagcaag	tgcattgtcat	gatggcatgg	540
gctggctaac	aatcggaatt	tcagggtccag	ataatggagc	agtggctgta	ttaaaaataca	600
acggcataat	aactgaaacc	ataaaaagtt	ggaggaagaa	aatattgagg	acacaagagt	660
ctgaatgtgc	ctgtgtaaat	ggttcatggt	ttactataat	gactgatggc	ccgagtgatg	720
gggtggcctc	gtacaaaatt	ttcaagatcg	aaaaggggaa	ggttactaaa	tcaatagagt	780
tgaatgcacc	taattctcac	tatgaggaat	gttctgttta	ccctgatacc	ggcaaagtga	840
tgtgtgtgtg	cagagacaat	tggcatgggt	cgaaccggcc	atgggtgtct	ttcgatcaaa	900

ES 2 593 082 T3

```

acctggatta tcaaatagga tacatctgca gtgggggtttt cggtgacaac ccgcgtcccg      960
aagatggaac aggcagctgt ggtccagtgt atgttgatgg agcaaacgga gtaaagggat      1020
tttcatatag gtatggtaat ggtgtttgga taggaaggac caaaagtcac agttccagac      1080
atgggtttga gatgatttgg gatacctaag gatggacaga gactgatagt aagttctctg      1140
tgaggcaaga tgttgtggca atgactgatt ggtcagggtg tagcggaagt ttcgttcaac      1200
atcctgagct gacagggcta gactgtatga ggccgtgctt ctgggttgaa ttaatcaggg      1260
gacgacctaa agaaaaaaca atctggacta gtgcgagcag catttctttt tgtggcgtga      1320
atagtataac tgtagattgg tcttggccag acggtgctga gttgccatto agcattgaca      1380
agtagtctgt tcaaaaaact ccttgtttct act                                  1413

```

5	<210> 9 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Un cebador sintético	
	<400> 9 cacacacggt ctccgggagc gaaagcaggc a	31
15	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Un cebador sintético	
	<400> 10 gggtttgtat ttgtgtgtca cc	22
25	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Un cebador sintético	
35	<400> 11 ccaggacact gaaatttctt tcac	24
40	<210> 12 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	
45	<400> 12 cacacaggtc tcctattagt agaaacaagg cattt	35
50	<210> 13 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	

	<400> 13 cacacaggtc tccgggagcg aaagcaggtc	30
5	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Un cebador sintético	
	<400> 14 cacacagtc tccatcatat aatcctcttg	30
15	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Un cebador sintético	
25	<400> 15 ctcctctgat ggtggcatac	20
	<210> 16 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Un cebador sintético	
35	<400> 16 cacacaggtc tcctattagt agaaacaagg tcgttt	36
40	<210> 17 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	
45	<400> 17 cacacagtc tccgggagcg aaagcaggta c	31
50	<210> 18 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	
55	<400> 18 cacacagtc tcctattagt agaaacaagg tactt	35
60	<210> 19 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Un cebador sintético	

	<400> 19 cacacacgtc tccgggagca aaagcagggg	30
5	<210> 20 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Un cebador sintético	
	<400> 20 cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg gtgtttt	37
15	<210> 21 <211>31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Un cebador sintético	
25	<400> 21 cacacacgtc tccgggagca aaagcagggg a	31
30	<210> 22 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	
35	<400> 22 cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg gtattttt	38
40	<210> 23 <211>31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	
45	<400> 23 cacacaggtc tccgggagca aaagcaggag t	31
50	<210> 24 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Un cebador sintético	
55	<400> 24 cacacaggtc tggtattagt agaaacaagg agttttt	38
60	<210> 25 <211>31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Un cebador sintético	

	<400> 25 cacacacgtc tccgggagca aaagcaggta g	31
5	<210> 26 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Un cebador sintético	
	<400> 26 cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg tagtttt	38
15	<210> 27 <211>31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Un cebador sintético	
25	<400> 27 cacacacgtc tccgggagca aaagcagggt g	31
	<210> 28 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Un cebador sintético	
35	<400> 28 cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg gtgtttt	37
	<210> 29 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Una secuencia de vector sintético	
45	<400> 29 gggttattgg agacgtacc gtctctccc ccc	33
50	<210> 30 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Una secuencia de vector sintético	
	<400> 30 ggggggagga gacgtaccg tctccaataa ccc	33
60	<210> 31 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético	

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(18),
 <223> n = A, T, C o G

 <400> 31
 cgtctcntat tagtagaa 18

 10 <210> 32
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) ... (17)
 <223> n = A, T, C o G

 <400> 32
 ttttgctccc ngagacg 17

 25 <210> 33
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(17)
 <223> n = A, T, C o G

 40 <400> 33
 cgtctcnggg agcaaaa 17

 <210> 34
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(18)
 <223> n = A, T, C o G

 55 <400> 34
 ttctactaat angagacg 18

 <210> 35
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético

 65 <400> 35
 tattagtaga a 11

5	<210> 36 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético	
10	<400> 36 gggagcaaaa	10
15	<210> 37 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético	
20	<400> 37 ggggtattag tagaa	15
25	<210> 38 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético	
	<400> 38 ttttgctccc ccc	13
35	<210> 39 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético	
	<400> 39 ggggggagca aaa	13
45	<210> 40 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Una secuencia de ADNc de virus de la gripe/vector sintético	
55	<400> 40 ttctactaat aaccc	15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de vectores de virus de la gripe, que comprende

a) un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB1 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB2 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de HA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NP del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de M del virus de la gripe vinculado a una secuencia de transcripción de la terminación, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NS del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, en los que los ADNc para PB1, PB2, PA, NP, M y NS poseen una región codificante para un polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1-6, y en los que los ADNc para HA y NA no poseen SEQ ID NO: 7 u 8, y en el que los vectores con ADNc de la gripe comprenden un promotor de la ARN polimerasa I y una secuencia de terminación de la ARN polimerasa I; y

b) un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB2 del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NP del virus de la gripe.

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de HA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de M1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de M2 del virus de la gripe, o un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NS2 del virus de la gripe.

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que los ADNc para PB1, PB2, PA, NP, M y NS poseen una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos 90 % con una de las SEQ ID NO: 1-6 o su complemento.

4. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el ADNc para HA es un subtipo de H5.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que HA es una HA de tipo A.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que el promotor de la ARN polimerasa I es un promotor de la ARN polimerasa I humano.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que cada vector de a) se encuentra en un plásmido distinto.

8. La composición de la reivindicación 1, en la que cada vector de b) se encuentra en un plásmido distinto.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que cada uno de los vectores de b) comprende además una secuencia de terminación de la transcripción de ARN.

10. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un vector que comprende un promotor vinculado a secuencias del virus de la gripe en 5' que comprenden secuencias no codificantes del virus de la gripe en 5' vinculadas a un ADNc de interés vinculado a secuencias del virus de la gripe en 3' que comprenden secuencias no codificantes del virus de la gripe en 3' vinculadas a una secuencia de terminación de la transcripción.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que el ADNc de interés se encuentra en orientación sentido.

12. La composición de la reivindicación 10, en la que el ADNc de interés se encuentra en orientación antisentido.

13. La composición de la reivindicación 10, en la que el ADNc de interés comprende un marco de lectura abierto codificante de un polipéptido o péptido inmunogénico de un patógeno o un polipéptido o péptido terapéutico.

14. Un método para preparar un virus de la gripe, que comprende: poner en contacto una célula con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en una cantidad eficaz para producir un virus de la gripe infeccioso.

15. El método de la reivindicación 14, que comprende además el aislamiento del virus.

16. Un método para preparar un vehículo de administración génica, que comprende: poner en contacto células con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en una cantidad eficaz para producir un virus de la gripe, y el aislamiento del virus.

17. Un método para preparar un virus de la gripe, que comprende poner en contacto una célula con un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB1 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de PB2 del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de HA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NP del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NA del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de M del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un ADNc de NS del virus de la gripe vinculado a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de PB2 del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NP del virus de la gripe, con el fin de producir un virus infeccioso, en los que los ADNc para PB1, PB2, PA, NP, M o NS poseen una región codificante para un polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1-6, y en los que los ADNc para HA y NA no poseen SEQ ID NO: 7 u 8, y en los que los vectores con ADNc del virus de la gripe comprenden un promotor de la ARN polimerasa I y una secuencia de terminación de la ARN polimerasa I.

18. El método de la reivindicación 17, en el que el ADNc para HA es un subtipo de H5.

19. El método de la reivindicación 17, que comprende además un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de HA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de M1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de M2 del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor vinculado operativamente a un segmento de ADN codificante de NS2 del virus de la gripe.

20. El método de la reivindicación 17 o 19, que comprende además un vector que comprende un promotor vinculado a secuencias del virus de la gripe en 5' que comprenden secuencias no codificantes del virus de la gripe en 5' vinculadas a un ADNc de interés o un fragmento de este último vinculado a secuencias del virus de la gripe en 3' que comprenden secuencias no codificantes del virus de la gripe en 3' vinculadas a una secuencia de terminación de la transcripción.

21. El método de la reivindicación 20, en el que el ADNc de interés comprende un marco de lectura abierto codificante de un polipéptido o péptido inmunogénico de un patógeno o un polipéptido o péptido terapéutico.

22. El método de la reivindicación 20, en el que el ADNc de interés se encuentra en orientación sentido.

23. El método de la reivindicación 20, en el que el ADNc de interés se encuentra en orientación antisentido.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, que comprende además el aislamiento del virus.

25. Un virus de la gripe de genoma reordenado aislado que comprende ARN genómicos virales con secuencias en SEQ ID NO: 1-6 y polipéptidos codificados por SEQ ID NO: 1-6 o un polipéptido con una sustitución conservativa en relación con el polipéptido codificado por al menos una de las SEQ ID NO. 1-6, y ARN genómicos virales para HA y NA que no poseen secuencias en SEQ ID NO: 7-8, en los que el ARN genómico viral para HA es un subtipo de H5, y en el que el virus de genoma reordenado crece en huevos con un título de al menos 10^{10} DIH₅₀/ml.

26. El virus de genoma reordenado de la reivindicación 25, en el que el H5 HA posee un fenotipo avirulento.

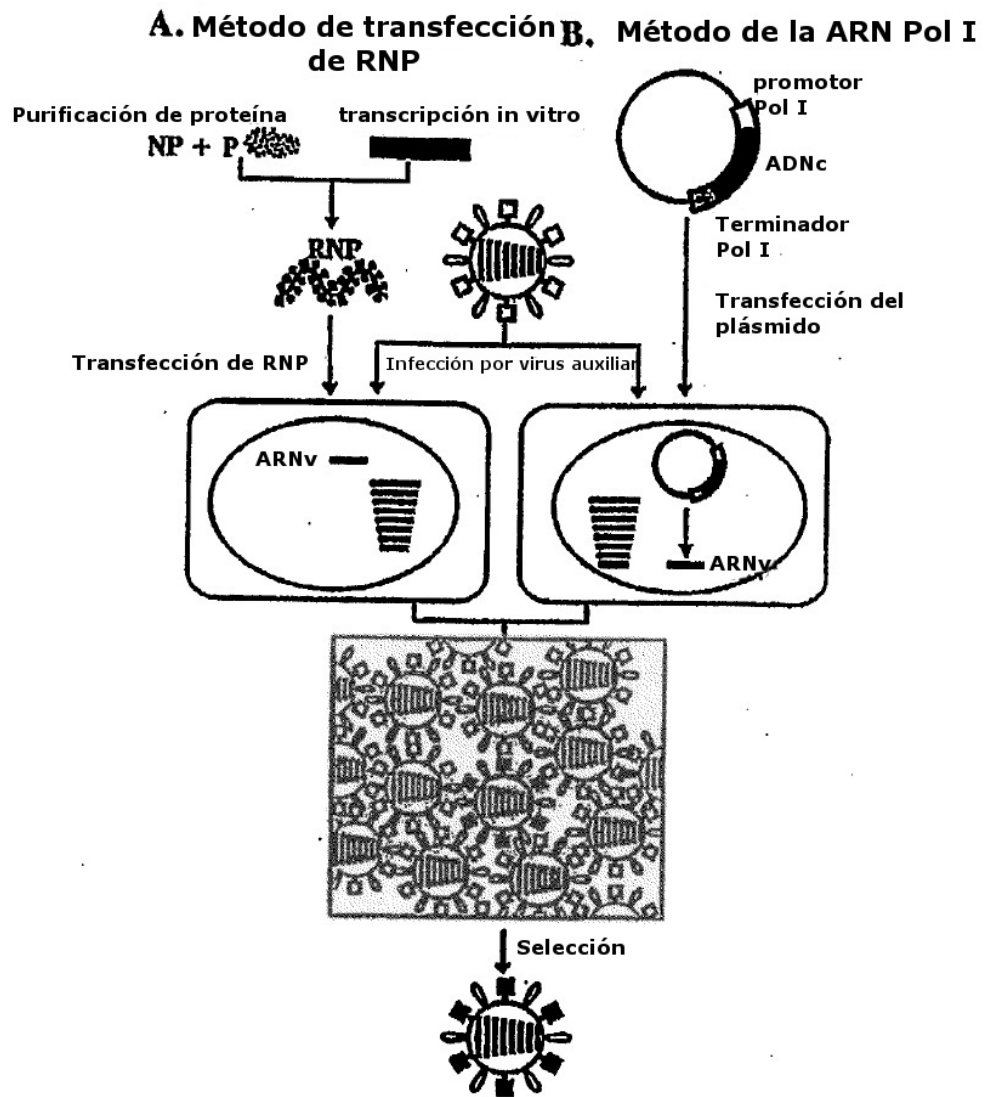


Fig. 1

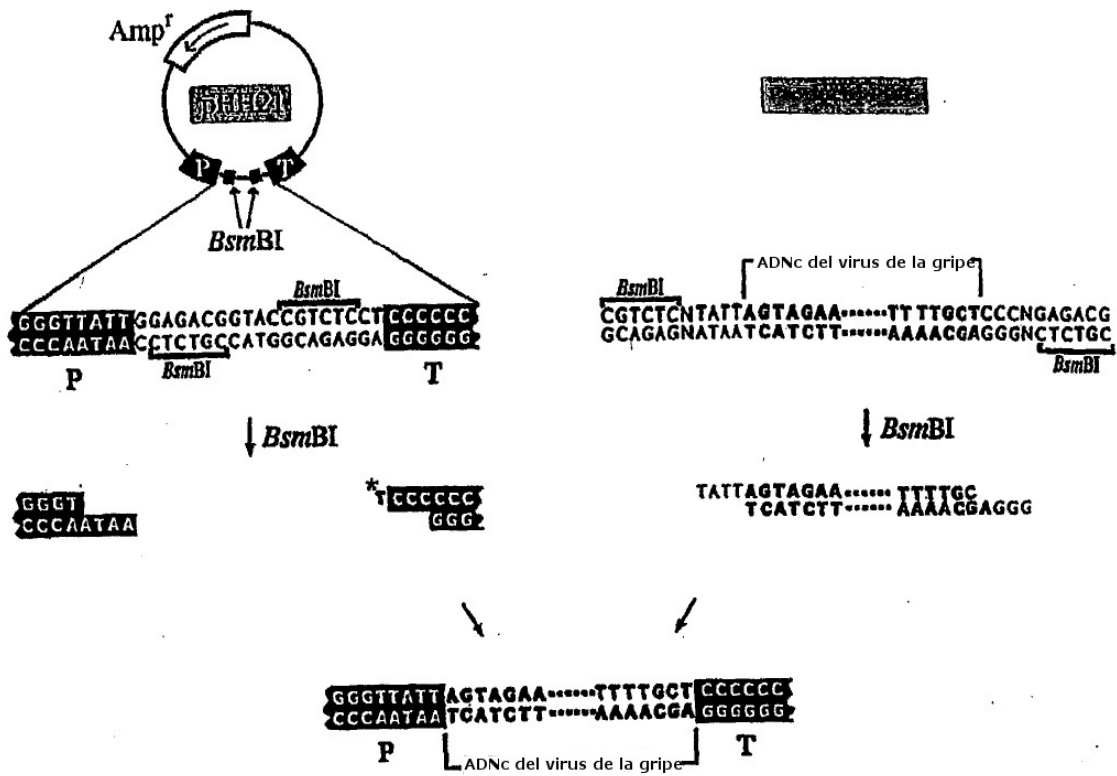


Fig. 2

Plásmidos que expresan
ARNv de la gripe

Plásmidos que expresan
las proteínas del virus de la gripe

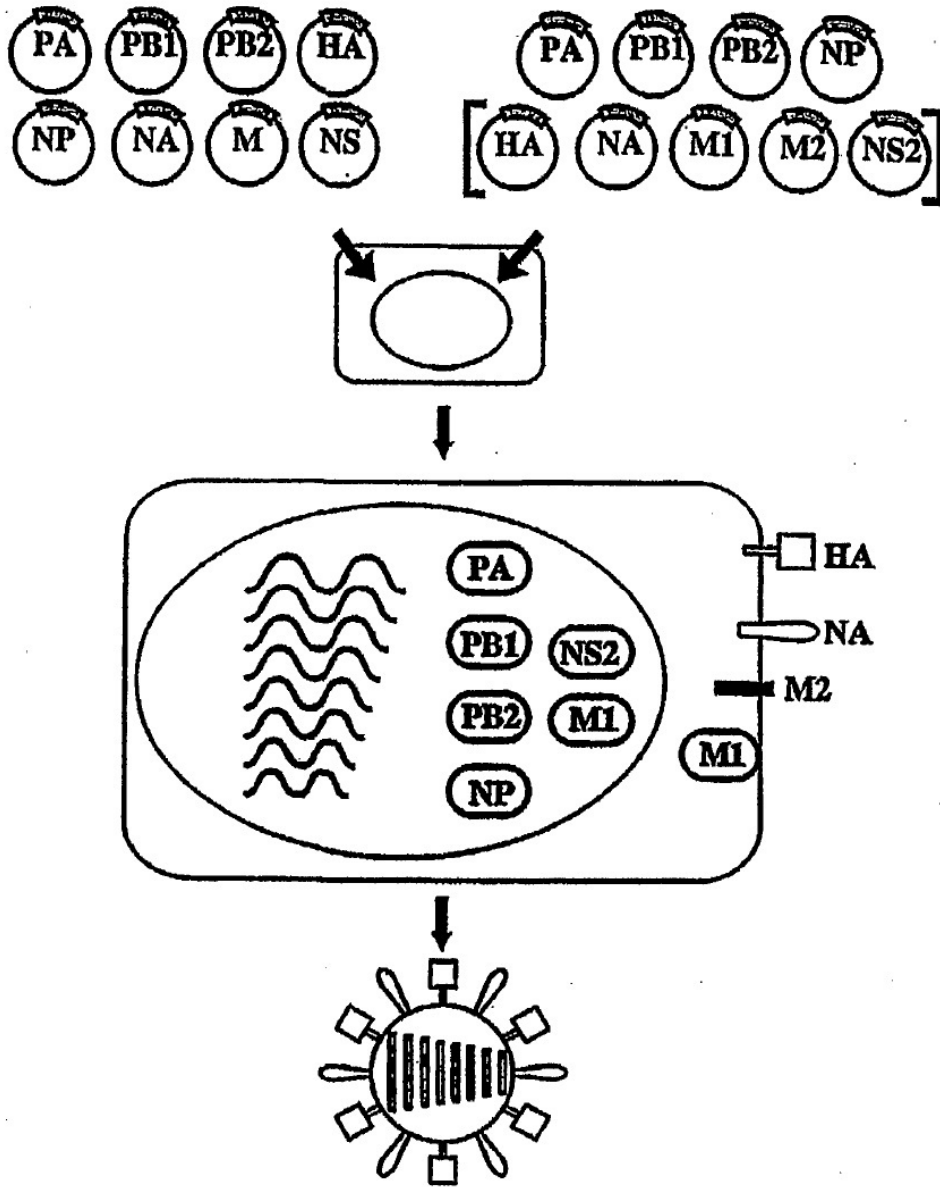
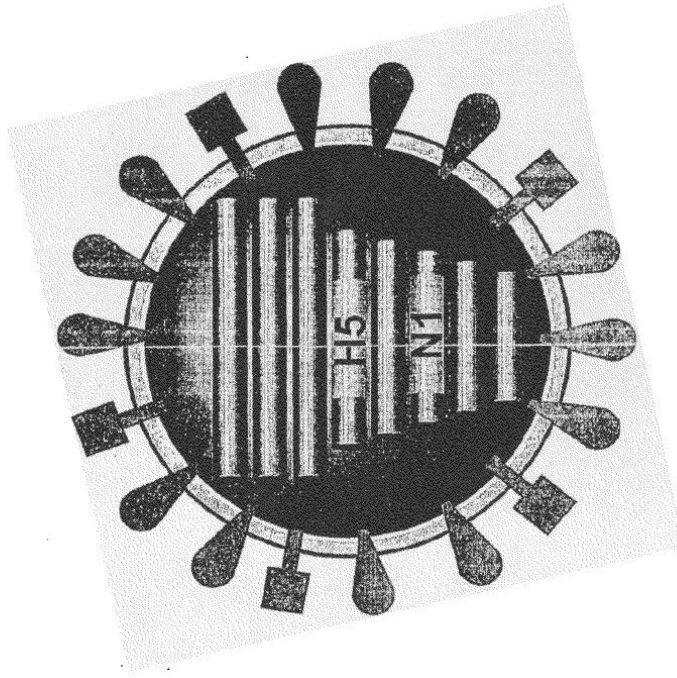


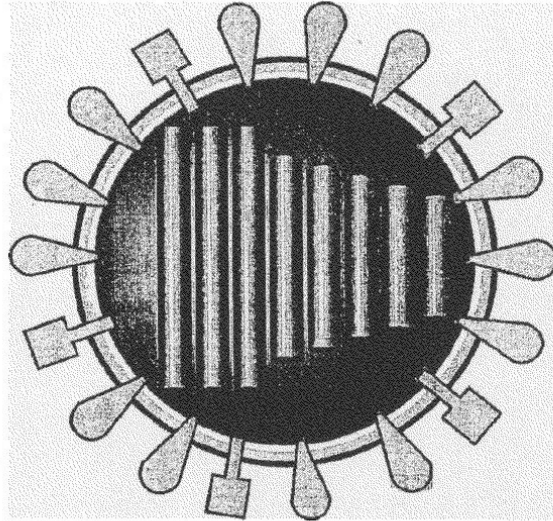
Fig. 3

H5N1-PR8



10^{10} DIH₅₀/ml
Título de HA: 1:3.200

A/PR/8/34 (H1N1)



10^{10} DIH₅₀/ml
Título de HA: 1:8.000