

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 802**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2009 PCT/DK2009/000247**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO2010060430**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2009 E 09795684 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2358386**

54 Título: **Vacunas contra la gripe optimizadas**

30 Prioridad:

28.11.2008 DK 200801688

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

02.06.2017

73 Titular/es:

STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)

Artillerivej 5

2300 Copenhagen S, DK

72 Inventor/es:

FOMSGAARD, ANDERS y

BRAGSTAD, KAROLINE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 614 802 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

Vacunas contra la gripe optimizadas

Campo de la invención

5 La descripción se refiere a vacunas de proteínas y nucleótidos que codifican proteínas de la gripe A con pocos sitios de glicosilación o ninguno. El ADN o ARN codifica hemaglutinina y/o neuraminidasa y/o matriz y/o nucleoproteína, en donde el origen del ADN o ARN puede ser cepas pandémicas de la gripe que codifican proteínas que tienen un contenido naturalmente bajo en sitios de glicosilación, y ADN o ARN procedente de cepas de la gripe no pandémicas, en donde los nucleótidos han sido mutados o se modifican de forma que codifican proteínas con menos sitios de glicosilación que la cepa estacional. La descripción también describe composiciones inmunogénicas y el uso del
10 ADN que codifica hemaglutinina (HA) y/o el ADN que codifica neuraminidasa (NA) que expresan el nuevo virus de la gripe A H1N1v pandémico del 2009 como un componente de la vacuna, combinado opcionalmente con ADN que codifica la matriz (M) y el ADN que codifica la nucleoproteína (NP) de la cepa H1N1 pandémica de 1918 y el ADN que codifica la HA y NA de una cepa reciente H3N2 estacional, para una vacuna combinada contra infecciones actuales y futuras de H1N1 y H3N2 en humanos y cerdos.

15 Antecedentes generales

La gripe es una de las enfermedades más antiguas y comunes conocidas por el hombre que causa entre tres y cinco millones de casos de enfermedad grave y entre 250.000 y 500.000 muertes cada año en todo el mundo. También los cerdos son susceptibles al virus de la gripe humana y aviar, ya que poseen ambos receptores en su tracto respiratorio. Por lo tanto, los cerdos se infectan y padecen neumonía procedente de cepas de la gripe humana y pueden servir como vehículo de una mezcla peligrosa para la generación de nuevas cepas recombinantes de la gripe con potencial de pandemia.

La gripe se propaga rápidamente en epidemias estacionales que afectan a un 5-15% de la población y la carga de los costes de atención médica y de falta de productividad son elevados (OMS). La enfermedad de tipo gripal fue descrita por primera vez por Hipócrates en el año 412 a. C. Hasta el siglo 19, se pensaba que la gripe era una infección bacteriana. El virus como agente causante fue determinado primero en 1931 por Richard Shope. La primera pandemia de gripe A conocida data de 1580 y desde entonces han tenido lugar 31 pandemias, de las cuales tres aparecieron en el siglo 20, a saber, la "gripe española" en 1918, la "gripe asiática" en 1957 y la "gripe de Hong Kong" en 1968, respectivamente. La pandemia de la gripe A H1N1 de 1918 fue la peor pandemia en los tiempos más recientes, causando de 20 a 50 millones de muertes en todo el mundo. La forma más común de gripe son los brotes estacionales y las epidemias de gravedad variable.

La zoonosis del virus de la gripe aviar (AIV, del inglés "avian influenza virus"), capaz de infectar seres humanos y cerdos y la propagación en Asia, partes de Europa y Oriente Medio, ha suscitado recientemente la preocupación por una pandemia que tendrá lugar también en el siglo 21. La cepa causante de la pandemia será probablemente desconocida hasta que la pandemia surja y habrá una necesidad urgente de una vacuna. Por lo tanto, se requerirá un diagnóstico y una caracterización rápidos de las cepas circulantes, así como de las cepas emergentes, nuevos enfoques para vacunas alternativas y formas de producción, con el fin de minimizar la gravedad de la pandemia. Dado que las vacunas estacionales de la gripe A también se producen en huevos, una epidemia de AIV altamente patógena entre las aves de corral también influirá en la producción de vacunas estacionales. Además, las vacunas tradicionales con proteínas de la gripe solo tienen un efecto protector limitado. También las vacunas estacionales tienen que cambiar cada temporada debido a la deriva genética del virus de la gripe A y a la inducción limitada de anticuerpos específicos de tipo, mediante vacunas tradicionales con proteínas de la gripe A. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevas vacunas alternativas contra la gripe A con propiedades diferentes.

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. La familia incluye tres géneros; los virus de la gripe A, B y C, identificados por diferencias antigénicas en su nucleoproteína (NP) y proteína matriz (M). El género virus de la gripe A se divide además en combinaciones de subtipos basados en diferencias antigénicas de las glicoproteínas de la superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La cepa A ha evolucionado para ser capaz de infectar diversas especies distintas de mamífero (por ejemplo, caballos y cerdos). Los virus de la gripe A de todos los subtipos antigénicos reconocidos de 16 HAs y 9 NAs, se han recuperado de aves acuáticas, pero pocos infectan otras especies animales, indicando que las aves acuáticas son los reservorios naturales de la gripe A.

50 Los virus de la gripe A han sido los agentes causantes de las pandemias principales y la mayor parte de los brotes anuales de gripe epidémica. Esta invención se centra únicamente en el género A de la gripe. El sistema de nomenclatura actual para los virus de la gripe humana incluye la ubicación geográfica del primer aislamiento, el número de cepas y el año del aislamiento. La descripción antigénica de HA y NA se indica entre paréntesis, por ejemplo, A/Moscú/10/99(H3N2). Las cepas no humanas también incluyen en la nomenclatura el hospedador de origen, por ejemplo, A/ánade real/Dinamarca/64650/03(H5N7).

El genoma del virus de la gripe A consiste en ocho segmentos de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario (ss) de orientación negativa, empaquetados en el núcleo vírico formado por la membrana de la célula hospedadora y una capa proteica de matriz 1 (M1). Los ocho segmentos están asociados con la nucleoproteína (NP) y tres proteínas de

gran tamaño; proteína polimerasa básica 1 (PB1) y 2 (PB2), y proteína polimerasa ácida (PA), que son responsables de la replicación y la transcripción del ARN. La NP encapsula el ARN y forma complejos de ribonucleoproteína (RNP) que protegen y estabilizan el ARN. Cada segmento incluye una secuencia de 11-13 nucleótidos en los extremos 5' y de 9-12 nucleótidos en los extremos 3' que están altamente conservadas y son similares para los virus A, B y C. Las principales glicoproteínas HA y NA, y la proteína M2 de canal iónico, están encajadas en una bicapa lipídica obtenida a partir del hospedador. Los virus de la gripe son algo pleomórficos en la forma, pero generalmente esféricos (80-120 nm de diámetro).

Todos los subtipos de gripe A se perpetúan en la población de aves acuáticas silvestres, se cree que es el reservorio natural de la gripe. En circunstancias normales, una infección gripal en los patos silvestres es asintomática. El virus se replica en el tracto intestinal y se excreta en concentraciones elevadas con las heces durante un período de hasta 30 días. Un virus de la gripe aviar puede persistir en el agua y conservar la infectividad durante aproximadamente 100 días a 17°C y se puede almacenar indefinidamente a -50°C. La circulación continua de virus de la gripe A podría deberse a los sitios en los que las aves pasan el invierno en las regiones subtropicales. Las cepas H5N1 de 2004 han llegado a ser muy estables y pueden sobrevivir durante 6 días a 37°C. El virus se destruye calentando a 56°C durante 3 horas o a 60°C durante 30 minutos. También desinfectantes, tales como compuestos de formalina y yodo destruyen eficazmente el virus de la gripe. Se ha creído que los virus de la gripe aviar estaban en estasis evolutiva en su hospedador natural, tolerándose entre sí el virus y el hospedador. Por lo general no se observan síntomas clínicos graves cuando las aves de corral están infectadas con la gripe aviar y el virus se describe como un virus de la gripe aviar de patogenicidad baja (LP AIV). Los subtipos H5 y H7 tienen el potencial de convertirse en altamente patógenos (HP) para los pollos, a través de la acumulación de mutaciones después de la transmisión a las aves de corral. Contrariamente a la creencia anterior, las aves migratorias salvajes podrían desempeñar alguna función en la transmisión de HP AIV. Miles de aves acuáticas silvestres en Hong Kong en el año 2002 y en China en el 2005 se infectaron con el virus de la gripe aviar HP AIV H5N1 y esto contribuyó a la propagación de HP H5N1 a Europa y África en el año 2005.

Se han aislado cepas de la gripe estacional a partir de seres humanos y de cerdos durante todo el año, pero en los climas templados es una enfermedad de invierno, probablemente porque la gente se reúne y se aloja en habitaciones poco ventiladas debido al clima frío.

De los 16 subtipos reconocidos de HA y 9 de NA, únicamente H1, H2, H3, N1 y N2 han circulado en los seres humanos y los cerdos en el siglo pasado. La introducción de pandemias en humanos con estos tipos fue en 1918 con H1N1, 1957 con H2N2 ("gripe asiática"), 1968 con H3N2 ("gripe de Hong Kong") y la introducción no pandémica del nuevo tipo de reagrupamiento génico H1N2 en el 2001, respectivamente. La antigenicidad de los virus de la gripe humana está cambiando constantemente por la acumulación de mutaciones en los sitios antigénicos de HA y NA, con lo que el virus es capaz de evitar el sistema inmune del hospedador causando epidemias. Una mutagénesis vírica se ve reforzada por la falta de "corrección de la lectura" en la replicación del ARN. La frecuencia de mutaciones es de aproximadamente uno de cada 100.000 nucleótidos. Los brotes de gripe estacional en el hemisferio norte suelen ocurrir entre octubre y abril y desde abril a octubre en el hemisferio sur. La deriva antigénica de los virus de la gripe humana está estrechamente controlada por el programa de vigilancia global de la gripe de la Organización Mundial de la Salud. Los componentes de la vacuna contra gripe de la próxima temporada para el hemisferio norte, se determinan en febrero, basándose en los conocimientos sobre las cepas circulantes actuales, y se reevalúan en septiembre para el hemisferio sur.

La deriva antigénica puede ocurrir de tres maneras. Ya sea por transmisión directa de una cepa aviar adaptada a los seres humanos, reagrupamiento genético o restablecimiento de una cepa "vieja". La posibilidad de que un virus de la gripe aviar cruce la barrera entre las especies e infecte directamente a los seres humanos, no se había reconocido antes de 1997, cuando 18 personas en Hong Kong enfermaron con HP AIV H5N1.

El origen de la pandemia de 1918 es objeto de controversia. Taubenberger et al., (Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 2005, 437:889-893) sugerían, basándose en la filogenia de los genes de la polimerasa, que el virus era enteramente de origen aviar. Sin embargo, hay grandes desacuerdos sobre el verdadero origen del virus y muchos todavía creen que también esa cepa pandémica es un reagrupamiento entre un virus de mamífero y ave, lo más probable que se produjera a partir de cerdos. Si el virus era de origen aviar, podría implicar que los virus aviares HP que circulan actualmente podrían causar una nueva pandemia por transmisión directa a los seres humanos. Un reagrupamiento antigénico se produce cuando segmentos víricos de dos virus antigénicamente diferentes, infectan la misma célula. El virus reagrupado contiene segmentos de ambas cepas y si el nuevo segmento introducido es HA (y NA), la antigenicidad completa del virus podría cambiar y el virus podría evadir la inmunidad del hospedador. Estos reagrupamientos pueden ser catastróficos si el virus es capaz de una replicación eficaz en el nuevo hospedador. En el peor de los casos, una cepa de este tipo reagrupada podría dar lugar a pandemias, infecciones que abarcan todo el mundo, frente a las cuales no tenemos una inmunidad preexistente. Las pandemias de 1957 y 1968 fueron reagrupamientos que adquirieron los genes de HA, NA y PB1 y los genes HA y PB1 de una fuente acuática, respectivamente. En 1977 volvió a surgir una cepa idéntica a las cepas H1N1 que circulaban antes de 1957. Los cerdos son posibles "vehículos de una mezcla" de virus reagrupados, debido a su tropismo receptor para el enlace α -(2,3) y α -(2,6) con galactosa. Otras especies, como el pollo y el hombre, también podrían servir como vehículos de una mezcla de cara a un cruce directo a los seres humanos desde una fuente aviar, después del descubrimiento de un receptor similar al α -(2,3) aviar en células también en los seres humanos y los pollos.

Se ha considerado que la evolución interpandémica de los virus de la gripe es debida a una deriva antigénica progresiva, debido a la mutabilidad del genoma de ARN. H3N2 ha sido el subtipo predominante que circula en los seres humanos desde 1968 y ha tenido una deriva rápida como un linaje único, mientras que ha habido una sustitución lenta de las variantes antigénicas de los virus H1N1. Se ha observado que la tasa de acumulación de mutaciones es de aproximadamente $4\text{-}5 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido por año para HA1, otros predicen una tasa de $5,7 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido por año. La HA y NA pueden evolucionar independientemente una de la otra y también se conocen reagrupamientos de los genes internos. La selección positiva se ha deducido sobre codones que participan en los sitios antigénicos de anticuerpos, epítomos de linfocitos T y sitios importantes para propiedades de crecimiento de virus en huevos. Una investigación reciente sobre los virus ha sugerido que la evolución de la gripe no siempre sigue un ritmo constante, pero que se caracteriza por procesos estocásticos, intervalos cortos de evolución rápida, intervalos largos de evolución con secuencia neutral y extinción lenta de linajes de virus coexistentes. La evolución parece también estar más influenciada por eventos de reagrupamiento entre un linaje cocirculante y la migración vírica, que lo que se creía anteriormente.

La vacunación es la opción preferida para una profilaxis de la gripe. Las vacunas antigripales inactivadas están autorizadas a nivel mundial, mientras que las vacunas vivas adaptadas al frío solo están autorizadas en Rusia y los EE.UU. La profilaxis preferida de las infecciones gripales anuales es la vacunación con vacunas de proteínas inactivadas procedentes de virus propagados en huevos de gallina. Por lo tanto, las vacunas comunes son los virus de vacunas inactivadas que se propagan en huevos de gallina y se inactivan con formaldehído o β -propiolactona. Existen tres clases de vacunas inactivadas; completa, dividida (alterada químicamente con éter o fosfato de tributilo) y subunidad (glicoproteínas de la superficie purificadas) administradas por vía intramuscular o subcutánea. La vacuna de la gripe inactivada completa no se utiliza actualmente debido a los altos niveles de efectos secundarios. La vacuna contra la gripe estacional (dividida y subunidad) es trivalente, comprendiendo las cepas de virus de la gripe A H3N2 y H1N1 y un virus de la gripe B. La dosis normal de vacuna humana está estandarizada en 15 μg de proteína HA de cada componente del virus, administrados una vez en adultos sanos normales y dos veces en niños y otras personas que no tienen una inmunidad preexistente contra la gripe A. Las vacunas convencionales inducen solo una respuesta inmune humoral. El efecto protector de la vacuna tradicional de proteínas divididas es muy limitado y debido a la continua evolución de las cepas de virus de la gripe A y los anticuerpos específicos de tipo inducidos por las vacunas convencionales, se tiene que producir una nueva vacuna cada año, basándose en la cepa de gripe A circulante más reciente. En caso de una nueva cepa humana emergente, son necesarias diversas mejoras en las vacunas. La producción en huevos es demasiado lenta (6-12 meses) en el caso de cepas emergentes. Si esa cepa es también un virus AIV altamente patógeno (HP) para las aves de corral, la producción en huevos podría ser imposible debido a que el virus mata el embrión del huevo. También la disponibilidad de huevos puede estar limitada, ralentizando la producción de vacunas. En el caso de no haber una inmunidad preexistente en la población, serían necesarias dos vacunaciones, lo que demoraría aún más la producción de vacunas. Incluso si no hay una nueva pandemia de gripe A entre los seres humanos, pero solo la propagación de HPV AIV entre las aves de corral, la escasez de huevos limitará la producción en huevos de vacunas tradicionales de la gripe estacional. Además, las vacunas tradicionales con proteínas de la gripe no ofrecen una protección óptima como profilaxis y ningún efecto terapéutico. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevas vacunas alternativas contra la gripe.

Aunque las vacunas de ADN se han desarrollado desde hace más de 16 años, son raros los ensayos clínicos que preceden a la fase I y II en los seres humanos. Sin embargo, se han autorizado dos vacunas de ADN veterinarias; una para el virus del Nilo Occidental (en caballos) y una segunda para el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa en salmones. Esto demuestra que las vacunas de ADN pueden tener buenos efectos protectores y que las nuevas vacunas de ADN no están limitadas por el tamaño del animal o la especie. El gran éxito con las vacunas de ADN, observado en el modelo murino para vacunas de ADN de primera generación, no se trasladaba bien a los seres humanos, sin embargo; los investigadores han demostrado recientemente niveles de anticuerpos protectores con una dosis única de vacuna de ADN de HA administrada con una pistola de genes a los seres humanos.

El documento WO 2006/082398 describe estructuras artificiales de ácido nucleico que se pueden emplear en una vacuna. Se describen estructuras artificiales que codifican un antígeno de la gripe pandémica, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos, y uno o varios antígenos de gripe no pandémica, fragmentos inmunogénicos de los mismos o variantes inmunogénicas o ambos.

Una "Inmunización con ácido nucleico" o el nombre comúnmente preferido, "vacunas de ADN" es la inoculación de ADN o ARN que codifica un antígeno, como casetes de expresión o vectores de expresión o incorporado en vectores víricos, con el fin de inducir una inmunidad contra el producto génico. Por lo tanto, en nuestra definición de vacunas de ADN, incluimos todo tipo de sistemas de administración del ADN o ARN que codifica un antígeno. El gen de la vacuna puede estar en forma de plásmido circular o de un casete de expresión lineal, solo con las características clave necesarias para la expresión (promotor, el gen de la vacuna y la señal de poliadenilación). Los sistemas de administración pueden ser más frecuentemente ADN desnudo en tampón con o sin adyuvante, ADN acoplado a nanopartículas y/o formulado en compuestos que contienen adyuvantes o insertado en vectores víricos o bacterianos vivos, tales como adenovirus, virus adenoasociado, alfavirus, poxvirus, virus herpes, etc. Las vacunas de ADN son muy prometedoras ya que provocan tanto una inmunidad humoral como una mediada por células, sin los mismos peligros asociados con las vacunas de virus vivos. En contraste con las vacunas de virus vivos atenuados, las vacunas de ADN se pueden administrar en tejidos o células iguales o diferentes, a los del virus vivo que tiene que unirse a receptores específicos. La producción de antígenos en sus formas naturales mejora la presentación de los

antígenos al sistema inmune del hospedador. A diferencia de las vacunas vivas atenuadas, las vacunas de ADN no son infecciosas y no pueden volverse virulentas. Las vacunas de ADN que expresan las proteínas HA, NA, M, NP o combinaciones de las mismas, han mostrado que inducen respuestas inmunitarias comparables a las de una infección vírica natural.

5 Las vacunas de ADN ofrecen muchas ventajas sobre las vacunas convencionales. Se pueden producir en grandes cantidades en poco tiempo, suprimen la necesidad de propagar en huevos, son rentables, reproducibles y el producto final no requiere condiciones de almacenamiento en frío, porque el ADN es estable y resistente a las temperaturas extremas. Todas las vacunas inactivadas, autorizadas actualmente son eficaces en la inducción de respuestas de anticuerpos humorales, pero solo las vacunas de virus vivos atenuados inducen eficazmente también una respuesta celular citotóxica.

10 Las vacunas de ADN inducen una respuesta inmune que es comparable a la respuesta obtenida mediante una infección natural con el virus, activando la inmunidad tanto humoral como la mediada por células (6,30). La amplia respuesta a las vacunas de ADN es un resultado de los genes codificados que se expresan a través de la célula hospedadora transfectada, induciendo tanto respuestas inmunes Th1 como Th2. La producción de antígenos en su forma natural mejora la presentación de los antígenos al sistema inmune del hospedador. En contraste, las vacunas convencionales basadas en proteínas de la gripe inactivadas, únicamente inducen una respuesta humoral (Th2), dirigida contra las glicoproteínas de la superficie del virus de la gripe. Este tipo de respuesta es ineficaz contra variantes de virus que han sufrido deriva y, por lo tanto, la composición del virus de la vacuna contra la gripe estacional tiene que ser evaluada cada temporada. Las respuestas de reactividad cruzada antigénicas son inducidas principalmente por las proteínas más conservadas de la gripe, tales como la nucleoproteína (NP) y la proteína matriz (M). Mediante la inclusión de estos genes en una vacuna de ADN, se observa una mayor reactividad cruzada entre cepas sometidas a deriva y heterólogas (4,7,8,13).

15 La infección y los síntomas gripales en hurones son muy comparables a los que se observan en los seres humanos y, por lo tanto, es uno de los mejores modelos para ensayos de vacunación contra la gripe (22). Las vacunas de ADN de HA antigripal en hurones también han mostrado ser efectivas previamente (18,32).

20 Previamente se había mostrado que la vacuna con el virus completo inactivado H1N1 de 1918 inducía una protección parcial contra la infección con H1N1 de 1918 en ratones (28), también vacunas de ADN actuales que codifican la HA de 1918 mostraron una protección completa de los ratones contra una exposición a H1N1 de 1918 (16) pero no se demostró ninguna protección contra la gripe de fecha actual.

25 Hemos demostrado que la vacuna de ADN plasmídico con codones optimizados, administrada mediante pistola de genes que codifica HA y NA, con o sin M y NP, basada en el virus pandémico H1N1 de 1918, induce protección en hurones contra una infección con un virus H1N1 de fecha actual (Bragstad et al. 2009 y documento WO-A-2008/145129). Esto demuestra una protección inducida con una vacuna que no está mediada por los anticuerpos anti-NA y anti-HA usuales, sino por un mecanismo inmunológico diferente, que implica más probablemente la inmunidad celular. Dado que las proteínas internas M y NP codificadas por el ADN y/o el virus de la gripe A están más conservadas entre las diferentes cepas de H1N1 que HA y NA, se puede esperar que la inmunidad inducida por las vacunas de ADN de NP y M sean más protectoras, lo que se podría extender también a nuevas cepas de H1N1. Los virus están separados por un intervalo de tiempo de 89 años y se diferencian en un 21,2% en la proteína HA1. Estos resultados sugieren no solo una capacidad única de las vacunas de ADN, sino también una característica única e inesperada de la HA y/o NA de 1918 en la inducción de una inmunidad protectora especialmente amplia y eficaz, incluso contra variantes de cepas que han tenido una deriva extrema. La presente invención describe que una respuesta inmune inducida con una vacuna de ADN que codifica HA y/o NA del virus de la gripe A H1N1 de 1918, proporciona un alto nivel de protección cruzada contra una infección gripal de fecha actual.

30 Las vacunas de ADN tienen capacidad de mecanismos inmunológicos estimulantes. Esto podría ser una razón por la que observamos una reactividad y una protección cruzadas bien inducidas frente a una infección estimulada. La protección cruzada y la reactividad cruzada inducidas por vacunas de ADN de cepas que difieren en un 11-13% en HA1, ha sido demostrada por otros autores (13-15), pero no tan alta como la divergencia del 21,2% que observamos nosotros.

35 Las vacunas contra la gripe que tienen la capacidad de inducir respuestas inmunes capaces de una reacción cruzada con variantes de virus sometidos a deriva e incluso cepas heterólogas, serían una gran ventaja tanto para el desarrollo anual de vacunas como en el caso de aparición de nuevas cepas.

40 Dado que la nueva gripe A (H1N1v) es marcadamente diferente de otros virus H1N1 humanos, se supone que la presente inmunidad contra el virus H1N1 y las vacunas estacionales contra H1N1 no inducirán una protección eficaz contra la nueva cepa. El nuevo virus H1N1v tiene una diferencia de aproximadamente un 5% en la secuencia de nucleótidos frente a otros virus H1N2 porcinos conocidos, mientras que tiene una diferencia de casi un 24% frente a virus H1N1 humanos que están circulando las últimas temporadas.

45 Por lo tanto, en la situación actual con un nuevo virus pandémico H1N1v y futuras variantes del mismo, creemos que la mejor vacuna contra los virus circulantes actuales y los virus en un futuro próximo será una vacuna de ADN que

comprenda los genes de HA y NA del nuevo virus pandémico H1N1v, los genes internos del virus pandémico previo H1N1 de 1918 y los genes de HA y NA del virus H3N2 estacional circulante. Los genes de la cepa H1N1v se incluirán para inducir una protección perfecta contra el H1N1v circulante y para futuras variantes de esta cepa. Esperamos que esta cepa con sus variantes sean los próximos virus H1N1 estacionales en los seres humanos. Los genes internos de NP y M de la pandemia H1N1 de 1918 están incluidos, ya que estos son los antepasados de todos los otros genes de NP y M en los virus de la gripe humana. Se espera que estos genes altamente conservados induzcan una mejor protección cruzada. Los genes de HA y NA del virus H3N2 estacional se incluyen ya que estos proporcionarán la mejor protección contra los virus H3N2 que circulan actualmente y futuros virus H3N2. Creemos que estas combinaciones de genes en una vacuna de ADN harán la vacuna más óptima contra la gripe universal, en el momento presente y para un futuro cercano.

Hemos observado sorprendentemente que una mezcla de plásmidos de ADN de ambos genes pandémicos "iniciales" con pocos o ningún sitio de glicosilación y opcionalmente genes del momento presente, induce la máxima protección, en el sentido de que los sitios más antigénicos serán expuestos al sistema inmune del hospedador para un reconocimiento con los anticuerpos. Alternativamente, genes de la gripe en los que todos o algunos de los codones de glicosilación han sido modificados/eliminados, de modo que la proteína expresada tiene menos o ningún sitio de glicosilación, se pueden utilizar en una mezcla de ellos mismos o con ADN de la gripe pandémica para crear una vacuna contra la gripe universal.

Compendio de la invención

Las cepas pandémicas de la gripe A fueron las primeras introducciones de los subtipos H3N2 y H1N1 en los seres humanos. Desde estas primeras introducciones, los virus han sufrido una deriva, acumulando mutaciones en sitios antigénicos pero también el patrón de N-glicosilación ha cambiado durante los años de deriva. La acumulación de secuencias de glicosilación ligada a N ayuda a enmascarar los sitios antigénicos para reconocimiento con el sistema inmune del hospedador. Las hemaglutininas iniciales "desnudas", por ejemplo, hemaglutininas con pocas o ninguna glicosilación, inducen una amplia reactividad cruzada frente a subtipos de gripe que han sufrido deriva. Nuestros resultados preliminares muestran que las vacunas de ADN de H1N1 de 1918 son candidatos tan buenos o mejores para la profilaxis de la gripe como las vacunas anuales basadas en proteínas convencionales, en hurones. La respuesta inmune de la vacuna de ADN generada contra estos inmunógenos "iniciales" puede tener una reacción cruzada con virus actuales, mientras que lo contrario puede no ser cierto. También el ADN de la gripe actual utilizado como vacuna, muestra una mejor profilaxis contra la gripe que las vacunas convencionales anuales a base de proteínas contra virus actuales.

El virus de la gripe elude el sistema inmune del hospedador mediante una acumulación de mutaciones, en especial en las glicoproteínas de la superficie HA y NA. Algunas de estas mutaciones generan sitios de glicosilación adicionales que pueden camuflar los sitios antigénicos en los glicoproteínas y el virus puede eludir de esta manera el sistema inmune del hospedador. Las cepas pandémicas iniciales poseían un bajo número de sitios de glicosilación, mientras que los virus actuales han acumulado sitios durante la deriva del virus. Desde la pandemia en 1918 con el virus H1N1, se han acumulado tres sitios de glicosilación adicionales en el virus H1N1 de 1999 incluido en nuestros experimentos, añadiendo el número total de sitios de N-glicosilación previstos a siete. El nuevo virus pandémico actual H1N1v también solo posee los cuatro sitios de glicosilación básicos como el virus de la pandemia de 1918.

La presente invención describe que una respuesta inmune inducida con una vacuna de ADN que codifica HA y NA del virus de la gripe A H1N1v sola o en combinación con una vacuna de ADN que codifica NP y M del virus H1N1 de 1918, proporciona un nivel elevado de protección cruzada frente al nuevo H1N1v así como futuras variantes de este H1N1v, así como una protección frente a infecciones con el virus de la gripe A H1N1 actual y futuro en humanos y cerdos. En combinación con la vacuna de ADN que codifica HA y/o NA de una cepa H3N2, preferentemente procedente de una cepa reciente (2005-2008), la vacuna de ADN actuará como una vacuna de ADN universal contra la gripe, induciendo una inmunidad protectora frente a los virus H1N1 y H3N2 circulantes futuros. La vacuna de ADN se puede utilizar en seres humanos y animales, por ejemplo, cerdos para prevenir/limitar una infección y/o propagación de una infección con cepas del virus de la gripe humana y de cerdo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe el uso de polinucleótidos que codifican proteínas de la gripe procedentes de una cepa H1N1 y una cepa H3N2, para la preparación de una composición inmunogénica o un componente de vacuna contra infecciones de la gripe A en seres humanos y cerdos, en donde los polinucleótidos codifican hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y proteína matriz (M) y la nucleoproteína (NP), en donde los polinucleótidos codifican SEQ ID NO: 11 y 13 y SEQ ID NO: 6 y 8 o 9, y en donde las secuencias de ADN o ARN contienen codones que están optimizados para una expresión en células de mamífero. La invención también se refiere a una vacuna contra infecciones de la gripe A de humanos y/o cerdos que comprende polinucleótidos que codifican proteínas de la gripe procedentes de una cepa H1N1 y una cepa H3N2, en donde los polinucleótidos codifican hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y proteína matriz (M) y la nucleoproteína (NP), en donde los polinucleótidos codifican SEQ ID NO: 11 y 13 y SEQ ID NO: 6 y 8 o 9, y en donde secuencias de ADN o ARN contienen codones que están optimizados para la expresión en células de mamífero.

- La presente invención describe el uso de nucleótidos que codifican proteínas de la gripe con pocos o ningún sitio de glicosilación para la preparación de una composición inmunogénica o un componente de vacuna contra infecciones de la gripe A actuales y futuras en humanos y cerdos, en donde los nucleótidos codifican hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) y/o proteína matriz (M) y/o la nucleoproteína (NP). Los nucleótidos pueden ser una mezcla de ADN o ARN pandémico con ADN o ARN no pandémico.
- En una realización preferida de la invención, el ADN o el ARN codifica HA y NA de H1N1v de 2009, M y NP de H1N1 de 1918 junto con HA y NA de H3N2 estacional.
- En una realización preferida de la invención, los codones de ADN o ARN están optimizados ("humanizados") por ejemplo, la secuencia de ADN para la hemaglutinina y la neuraminidasa y la matriz y la nucleoproteína se modifica de modo que la secuencia que codifica dichas proteínas está modificada para que se exprese de manera óptima en células de mamífero.
- En otra realización, el ADN o ARN no pandémico está mutado de modo que los codones se modifican de forma que la secuencia codifica proteínas con menos sitios de glicosilación que la cepa estacional. Preferiblemente, se modifican algunos o todos los codones que codifican Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.
- La presente invención también describe el uso de nucleótidos que codifican la hemaglutinina (HA) de una o varias cepas de gripe pandémica (por ejemplo, el virus de la gripe A H1N1v de 2009, H1N1 de 1918 y/o H2N2 de 1957 y/o H3N2 de 1968) como un componente de la vacuna contra infecciones por gripe A que contiene H1, H2, H3, N1, N2 actuales/futuras en humanos y cerdos.
- La hemaglutinina y/o neuraminidasa y/o proteína matriz y/o la nucleoproteína del virus de la gripe pandémico, se pueden opcionalmente incluir como proteínas y/o vacunas de ADN.
- En otra realización, la vacuna comprende una mezcla de proteínas de la gripe o ADN con codones optimizados que codifica las proteínas HA y NA del virus pandémico H1N1v de 2009 y/o la proteína matriz y la nucleoproteína del virus H1N1 de 1918 y/o HA y NA de un virus reciente H3N2 de 2005, como un componente de la vacuna contra infecciones de la gripe A que contienen H1, H3, N1, N2 actuales o futuras en humanos y cerdos.
- La vacuna se administra mediante inyección de ADN y/o ARN desnudo, con o sin electroporación o se inocula mediante una pistola de genes. Alternativamente, los genes de la vacuna se administran incorporados en cuerpos apoptóticos celulares o en un virus vivo, tal como adenovirus, poxvirus, virus adenoasociado, alfavirus, virus herpes y/o bacterias tales como especies de Shigella o especies de Salmonella o especies de Lactobacillus o especies de Lactococcus. Otra forma de administración es mediante una inyección de solución salina o de tampón de ADN y/o ARN desnudo en una formulación a base de lípidos, con o sin adyuvante, para administrar en la mucosa del tracto respiratorio, tal como nasal y/o intratraqueal.
- Además de lo mencionado, la vacuna puede comprender adicionalmente hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) y/o proteína matriz (M) y/o la nucleoproteína (NP) mencionadas anteriormente, seleccionadas a partir de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 o dichas proteínas aisladas.
- En otra realización, la vacuna comprende una vacuna secuencial con ADN/ARN o proteína pandémica, seguida de una vacunación con ADN/ARN o proteína no pandémica (refuerzo inductor).
- En otra realización, la vacuna comprende HA con/o sin NA de la nueva cepa de virus de la gripe A aviar (AIV) circulante, poco patógena (LP) H5N7 de 2001 (A/Ánade real/Dinamarca/64650/03(H5N7)) como vacunas de ADN y/o proteínas. La vacuna está destinada a proteger las aves y a los seres humanos y los cerdos frente a las cepas H5 de la gripe A.
- También se describe una vacuna que comprende HA con o sin NA y/o M y/o NP de la cepa de virus de la gripe A aviar (AIV) introducida recientemente y circulante, altamente patógena H5N1 de marzo del 2006 Dinamarca (A/halcón/Dinamarca/6370/06(H5N1)) como vacuna de ADN y/o proteínas. La vacuna está destinada a proteger ampliamente las aves y los seres humanos y los cerdos frente a cepas de la gripe A que contienen H5.
- La presente invención describe el uso de genes pandémicos con codones optimizados en PCR transcripcionalmente activa, para la generación de genes activos transcripcionalmente para uso directo como vacunas de ADN. De este modo, no se utiliza la estructura principal de plásmido. Los productos de la PCR contendrán todos los componentes para una expresión eficaz de los genes en células eucariotas.
- Las vacunas mencionadas anteriormente se pueden utilizar de forma profiláctica y terapéutica.

Definiciones

Gripe pandémica:

Un virus pandémico es un virus que es nuevo en el sentido de que hay poca o ninguna inmunidad preexistente fren-

te al virus en la población humana y, por tanto, el virus se propagará en todas las partes del mundo.

Glicosilación:

Una glicosilación ligada a N es una adición eucariótica cotraduccional y postraduccional de sacáridos en el nitrógeno de la amida de las cadenas laterales de asparagina. Una etapa de modificación en la síntesis de glicoproteínas.
 5 Estas glicosilaciones son esenciales para el plegamiento correcto y la estabilidad de la glicoproteína. Glicosilaciones en, o cerca de, los sitios de unión a antígeno pueden interferir con el reconocimiento de la proteína por la célula hospedadora. De este modo, las glicosilaciones pueden ayudar a enmascarar la proteína del sistema inmune del hospedador.

Sitios de glicosilación:

10 Los sitios de glicosilación se definen en esta memoria como glicosilaciones expuestas en la parte superficial de la proteína. Para proteínas unidas a la membrana, tales como HA y NA, una parte de la proteína está expuesta en el exterior del virus y la glicosilación en esta parte de la proteína es importante para la virulencia del virus y/o para la exposición de sitios inmunogénicos/antigénicos. Para H1N1 de 1918 y H1N1v de 2009, los sitios de glicosilación son 4, mientras que H1N1 estacional tiene ahora 6 sitios de glicosilación, pero puede acumular más en el futuro. Del
 15 mismo modo, para H3N2 de 1968 los sitios de glicosilación son 6 mientras que H3N2 estacional tiene 8 sitios de glicosilación. Pocos sitios de glicosilación debe ser la base para un plegamiento correcto de la proteína y deben estar presentes y se encuentran siempre, incluso en cepas pandémicas no adaptadas. Estos sitios de glicosilación están conservados. A lo largo del tiempo, la proteína del virus acumula más sitios de glicosilación expuestos en la superficie para "enmascarar" la inmunidad y, por lo tanto, volverlo más adaptado y probablemente menos virulento.

20 ADN mutado:

La mutagénesis dirigida al sitio en las glicoproteínas de la superficie del virus de la gripe va a alterar el patrón de glicosilación. Se pueden mutar nucleótidos en sitios de secuencias para alterar los codones en el tripéptido del sitio de glicosilación. De esta manera, se pueden eliminar los secuencias seleccionados.

25 Alternativamente, la proteína en la que se debe eliminar la glicosilación, se puede producir en un hospedador no eucariota. También tal proteína de vacuna no glicosilada se puede suministrar a partir de un hospedador de este tipo no eucariota, tal como bacterias como las bacterias *Lactococcus*, mediante la administración de las bacterias transfectadas directamente en las superficies mucosas, por ejemplo, en la nariz o por vía oral al intestino, en donde el organismo producirá la proteína de la vacuna *in situ*.

Hemaglutinina:

30 El nombre hemaglutinina proviene de la capacidad de los virus para aglutinar glóbulos rojos. La glicoproteína HA de la envuelta es un trímero en forma de varilla con monómeros idénticos. La proteína HA se sintetiza en la célula infectada como una única cadena polipeptídica, HA0. Esta molécula inicial tiene que ser escindida por las proteasas de la célula hospedadora en las subunidades HA1 (47 kDa) y HA2 (29 kDa) ligadas con disulfuro, para que el virus medie en la fusión de membranas y la subsiguiente infección. La subunidad HA1 es el dominio globular de la molécula de
 35 HA, que comprende el sitio de unión al receptor, responsable de la fijación del virus a los receptores de ácido siálico de la célula hospedadora. Los cinco sitios antigénicos A, B, C, D y E en la cabeza globular dirigen la respuesta de los anticuerpos del hospedador. La HA es el antígeno vírico primario y el único antígeno que induce una respuesta neutralizante del virus en el hospedador. Las principales funciones de HA son la fusión del virión con la membrana celular del hospedador y la fusión del virión endocitado con la membrana endosómica, lo que permite una liberación del genoma en el citoplasma. HA es una proteína integral de membrana de prototipo 1 que se dirige a la membrana del RE a través de una secuencia peptídica señal, N-terminal y que se escinde con la peptidasa señal. La subunidad HA2 forma el tronco de la molécula. El extremo N-terminal de HA2 (péptido de fusión) es hidrófobo y está altamente conservado en las HAs de diferentes cepas de virus de la gripe, y es esencial en la actividad de fusión de HA. La HA se modifica después de la traducción mediante la adición de carbohidratos ligados a N en residuos de asparagina
 45 (N) en cada monómero, y ácido palmítico a residuos de cisteína (C) en la región de la cola citoplasmática. HA se une al ácido 5-N-acetil neurámico (ácido siálico) en la superficie de la célula hospedadora y las posiciones son esenciales para la determinación del tropismo celular preferido del hospedador. Las cepas infecciosas humanas se unen preferentemente al ácido siálico con un enlace α -(2,6) a galactosa, mientras que los virus de la gripe aviar (AIV) se unen preferentemente a α -(2,3)

50 Neuraminidasa:

La neuraminidasa (NA) es una glicoproteína de la membrana de la envuelta de clase II con actividad enzimática. Es un tetrámero con monómeros idénticos que tienen una forma de tipo hongo. La región del tallo hidrófobo está anclada a la membrana y la cabeza globular contiene el sitio activo de la enzima y los tres sitios antigénicos A, B y C de la molécula. La función principal es catalizar la escisión de enlaces glicosídicos adyacentes al ácido siálico. La actividad es esencial para que los viriones de la progenie se liberen de forma eficaz desde la superficie de la célula infectada. Al igual que HA, NA se modifica de forma posterior a la traducción con glicosilaciones ligadas a N. La molécula de NA es una diana de fármacos antivirales como zanamivir y oseltamivir. La inhibición de NA impide la liberación

del virus desde la célula infectada y retrasa la propagación del virus. En la actualidad se han reconocido nueve subtipos de NA.

Proteínas matriz:

5 Las proteínas matriz consisten en dos proteínas, la proteína del canal iónico M2 y la proteína estructural M1. La proteína M1 es una proteína matriz que recubre el lado interior de la membrana derivada de la célula hospedadora infectada, proporcionando una estructura y rigidez a la membrana. La proteína M1 contiene un dominio de unión a lípidos hidrófobo y un dominio de unión a RNP. El ensamblaje del virus de ARN de cadena negativa requiere una localización de las proteínas M1 en la membrana plasmática. Las proteínas M1 se unen a las colas citoplasmáticas de HA, NA y M2, especialmente NA estimula la unión a la membrana a través de las proteínas M1. M1 junto con NS2 es necesaria para la exportación de RNPs genómicas desde el núcleo, M1 también inhibe la síntesis de ARN. 10 La proteína M2 es una pequeña proteína de membrana integral homotetrámera, y canal de iones, traducida a partir de un ARNm cortado y empalmado en el marco de lectura +1. El canal de iones es activado por el pH bajo del endosoma, permitiendo que los protones entren en el interior del virus, lo que conduce a cambios conformacionales en M1, alterando las interacciones entre M1-RNP. El canal iónico M2 es una diana de fármacos antivirales como amantadina y rimantadina. 15

Nucleoproteína:

La nucleoproteína (NP) es muy básica y se une a la cadena principal de azúcar-fosfato de ARN vírico de una manera no específica de la secuencia, aproximadamente cada 25 nucleótidos. NP interactúa tanto con PB1 como con PB2 y con una variedad de otras proteínas víricas y celulares. La interacción con M1 controla la actividad transcripcional de las RNPs y su tráfico intracelular. NP es responsable principalmente de mantener la estructura de las RNPs y de la regulación de la transcripción y la replicación del genoma, la polimerasa no puede utilizar ARN vírico desnudo como molde. La NP asociada con ARN vírico es abundante en el líquido extracelular y el tejido pulmonar durante una infección grave con el virus de la gripe A. 20

El virus de la gripe de 1918:

25 La pandemia más grave de este siglo fue la "gripe española" con H1N1 de 1918. El virus mató entre 40 y 50 millones de personas en todo el mundo durante 1918 y 1919 (10). Basándose en especímenes conservados, se han caracterizado genéticamente todos los genes y todo el virus ha sido restaurado (27). Esto proporciona una oportunidad única para dilucidar los mecanismos de inmunopatogénesis de la cepa pandémica. El origen de la pandemia de 1918 es objeto de debate. Taubenberger et al. 2005 sugieren, basándose en un análisis filogenético de los genes de la polimerasa, que el virus era enteramente de origen aviar. Sin embargo, hay grandes desacuerdos sobre el verdadero origen del virus y muchos todavía creen que esta cepa pandémica también era un reagrupamiento entre un virus de mamífero y de ave (Taubenberger et al., 2005, Antonovics et al., 2006). Los genes de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) de la cepa H1N1 de 1918 no poseen indicadores genéticos conocidos para la alta virulencia, que podrían haber explicado la grave enfermedad observada en los seres humanos (Reid et al., 1999 y 2000). Sin embargo, la proteína HA (y la NA) en una estructura principal de virus humanos recientes confería una patogenicidad mejorada en ratones (Kobasa et al., 2004, Tumpey et al., 2005b). Podría haber sido la combinación de genes más que la propia HA, lo que causara el fenotipo letal (Tumpey et al., 2005). La incertidumbre sobre el origen y los mecanismos de la virulencia elevada del virus H1N1 de 1918 ha planteado la cuestión de si es posible desarrollar una inmunidad protectora frente a ese virus. Se ha publicado recientemente que una vacuna de ADN que codifica la HA de la cepa H1N1 de 1918 mostraba protección frente a una exposición letal a la cepa recombinante del virus H1N1 de 1918 en ratones (Kong W et al., 2006). Los genes de NP y M de la pandemia de 1918 son los ancestros de los genes de NP y M de los virus H1N1, H3N2 y H2N2 que circulan en la actualidad. Estos genes también están muy conservados y se modifican menos que las glicoproteínas de la superficie a lo largo del tiempo. 40

El virus de la gripe A H1N1v de 2009:

45 Durante abril del 2009, se descubrió un nuevo virus de la gripe H1N1v en California y también se reconoció que había causado brotes anteriores en México el mismo año. El virus no estaba relacionado con virus de la gripe humana anteriores, tanto genética como antigénicamente. La nueva cepa H1N1v está relacionada más estrechamente con los virus porcinos con reagrupamiento triple. La OMS anunció en junio que el virus H1N1v era un virus pandémico y en noviembre de 2009, 206 países y territorios o comunidades de ultramar describieron casos confirmados de gripe pandémica H1N1v, incluyendo más de 6770 muertes. Las vacunas de la gripe con proteína están ahora disponibles contra la nueva cepa pandémica, sin embargo, estas vacunas necesitan ser evaluadas ya que el virus se modifica. Nuestro objetivo es generar una vacuna de ADN universal que proteja incluso frente a virus H1N1v con una deriva amplia. 50

Virus H3N2 estacionales:

55 La primera introducción de los virus H3N2 en humanos se produjo mediante la pandemia de 1968. Este virus era el resultado de un reagrupamiento entre los virus H3 aviar y los virus H2N2 de la pandemia de 1957. Desde entonces, H3N2, y más tarde, H1N1, han circulado conjuntamente entre la población humana causando brotes estacionales y epidemias. Los virus H3N2 se modifican lo suficiente a lo largo del tiempo para que cambie la composición de la

vacuna de proteína.

Las cepas pandémicas de 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2) eran ambas el resultado de un reagrupamiento genético con virus aviares (11,17). El origen de la pandemia de 1918 es objeto de debate. Taubenberger et al., (26) sugirió basándose en un análisis filogenético de los genes de la polimerasa, que el virus era enteramente de origen aviar. Sin embargo, hay grandes desacuerdos sobre el verdadero origen del virus y muchos todavía creen que esta cepa pandémica también era un reagrupamiento entre un virus de mamífero y de ave (1,26). Los genes de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) de la cepa H1N1 de 1918 no poseían indicadores genéticos conocidos de una virulencia elevada, lo que podría haber explicado la gravedad observada en los seres humanos (19,20). Sin embargo, la proteína HA (y NA) en una estructura principal de virus humanos recientes, confería una patogenicidad mejorada en ratones (12,29). Podría haber sido la combinación de genes más que la propia HA lo que causara el fenotipo letal (27). La incertidumbre sobre el origen y los mecanismos de la virulencia elevada del virus H1N1 de 1918 ha planteado la cuestión de si es posible desarrollar una inmunidad protectora frente a ese virus. Se ha publicado recientemente que una vacuna de ADN que codifica la HA de la cepa H1N1 de 1918, mostraba protección frente a una exposición letal a la cepa recombinante del virus H1N1 de 1918 en ratones (Kong W, Hood C, Yang Z, Wei C, Xu L, Garcia-Sastre A, Tumpey TM, Nabel GJ. Protective immunity to lethal challenge of the 1918 pandemic influenza virus by vaccination. PNAS 103(43):15987-91, 2006)

Vacunas de ADN o ARN:

De aquí en adelante, la expresión "vacunas de ADN" se refiere a vacunas de nucleótidos que significa tanto vacunas de ADN como vacunas de ARN. La vacuna de ADN se puede administrar como ARN o ADN, ya sea como plásmido de ADN "desnudo" con o sin un compuesto a base de lípidos o células apoptóticas para facilitar la captación celular, proporcionar un efecto de depósito y/o un efecto de adyuvante, incluyendo o no una molécula de proteína adyuvante y/o plásmidos de ADN que codifican tal o tales proteínas adyuvantes, para una inducción inmune mejorada y óptima. Los genes de vacunas de ADN se pueden inyectar con o sin un apoyo tal como electroporación, o administrar por chorro de aire o recubiertos sobre partículas como con una pistola de genes, o se pueden administrar en superficies mucosas, por ejemplo, por vía intranasal y/o por vía intratraqueal. Los genes de vacunas de ADN también se pueden incorporar en un vector vírico o bacteriano para administrar, tales como adenovirus, poxvirus, virus adenoasociado, alfavirus, citomegalovirus, y/o bacterias tales como especies de Lactococcus o Lactobacillus o Shigella o Salmonella.

Los dos tipos más comunes de administración de una vacuna de ADN son una inyección salina de ADN desnudo e inoculaciones de ADN con pistola de genes (ADN recubierto en perlas de oro macizo, administradas con presión de helio). Una inyección intramuscular de solución salina de ADN genera preferentemente una respuesta Th1 de IgG2a, mientras que la administración con pistola de genes tiende más a iniciar una respuesta Th2 de IgG1. Los plásmidos inyectados intramuscularmente tienen riesgo de ser degradados por desoxirribonucleasas extracelulares, sin embargo, las respuestas inducidas son frecuentemente más prolongadas que las inducidas por el método de pistola de genes. Una vacunación mediante administración de ADN con una pistola de genes, en la epidermis, ha mostrado ser el método más eficaz de inmunización, probablemente porque la piel contiene todos los tipos de células necesarias, incluyendo células especializadas presentadoras de antígeno (APC), para provocar una respuesta inmune tanto humoral como celular citotóxica (células de Langerhans y dendríticas). Una protección completa frente a una dosis letal de virus de la gripe se ha obtenido con tan poco como 1 µg de ADN en ratones. El vector de la vacuna de ADN convencional consiste en el gen de interés clonado en un plásmido bacteriano modificado genéticamente para tener una expresión óptima en células eucariotas. Las características esenciales incluyen; un origen de replicación que permite la producción en bacterias, un gen de resistencia a antibióticos bacterianos que permite la selección del plásmido en un cultivo bacteriano, un promotor constitutivo fuerte para una expresión óptima en células de mamífero (los promotores obtenidos a partir de citomegalovirus (CMV) o virus de simio proporcionan la expresión génica más elevada), una secuencia de poliadenilación para estabilizar los transcritos de ARNm, tal como poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BHG) o poliadenilación del virus de simio, y un sitio de clonación múltiple para la inserción de un gen de antígeno. Una secuencia de intrón A mejora notablemente la expresión génica. Muchos vectores de vacunas de ADN bacterianas contienen motivos de dinucleótidos no metilados de citidinafosfato-guanosina (CpG) que pueden provocar fuertes respuestas inmunitarias, innatas en el hospedador. En los últimos años ha habido varios enfoques para mejorar y personalizar la respuesta inmune frente a estructuras artificiales de vacuna de ADN (vacunas de ADN de segunda generación). Por ejemplo, vectores dicistrónicos o plásmidos que expresan múltiples genes se han utilizado para expresar dos genes simultáneamente. Se han modificado genéticamente promotores específicos que restringen la expresión génica a ciertos tejidos, y se han construido genes de fusión de citocina/antígeno para mejorar la respuesta inmune. Además, los genes pueden tener los codones optimizados para una expresión génica óptima en el hospedador y se pueden sustituir secuencias líderes sin tratamiento previo por líderes optimizados que incrementan la eficacia de la traducción.

La administración de una vacuna de ADN puede ser mediante inyección de una solución salina o una solución salina tamponada de ADN o ARN desnudo, o una inyección de plásmido de ADN o de fragmentos de ADN lineales que expresan genes, acoplados a partículas o administrados mediante un vector vírico tal como adenovirus, virus vaccinia de Ankara modificado (MVA), virus vaccinia, virus adenoasociado (VAA), alfavirus, etc. Las vacunas de ADN se podrían administrar ya sea mediante una pistola de genes como en los ejemplos anteriores, o como una inyección con o sin electroporación.

5 Cuando se emplea una vacuna de ADN que codifica proteínas de la superficie (HA y/o NA) de una cepa pandémica (por ejemplo, H1N1 de 1918 o H3N2 de 1968 o H2N2 de 1957) en combinación con HA y/o NA de cepas actuales que han sufrido deriva de H1N1 o H3N2 o H2N2, esperamos una inducción preferente de anticuerpos con reacción cruzada (anticuerpos de protección amplia) con anticuerpos comunes más conservados y epitopos de linfocitos T. Por lo tanto, se debe obtener una protección más amplia cuando se vacuna con proteínas de la superficie, ya sea como una vacuna de ADN y/o una vacuna de proteínas que se obtienen a partir de las cepas pandémicas originales mencionadas, junto con HA y/o NA de cepas de virus actuales como vacuna de ADN y/o una vacuna de proteínas, y esto se puede realizar de forma importante, ya sea como una mezcla o como una secuencia (refuerzo inductor) primero con antígenos pandémicos o actuales y cepas actuales o pandémicas en un momento posterior. Como consecuencia, obtendremos una respuesta anti-gripe A más amplia mediante la vacunación (ADN y/o proteína) a partir de cepas pandémicas en individuos que ya están vacunados con una vacuna de proteína actual. Al contrario, podemos obtener una cobertura antigripal más amplia frente a cepas futuras de la gripe cuando inducimos con ADN y/o proteína de HA y/o NA procedente de cepas pandémicas y reforzamos con una vacuna contra la gripe de proteínas en cualquier momento en el futuro.

15 Optimización de codones:

La optimización de codones es el intercambio completo de los codones de un virus por los de genes humanos expresados de forma elevada y, por tanto, también genes de mamífero que incluyen los cerdos. La optimización de codones no modifica los aminoácidos codificados de los antígenos de proteínas codificadas, pero puede aumentar la expresión de proteínas eucariotas en células de mamífero. Puesto que los genes de proteínas humanas que se expresan de forma elevada tienen un alto contenido en C y G, hay una mayor posibilidad de generar ambos motivos GpG estimuladores inmunes, pero también secuencias GC inhibitoras inmunes. Los genes modificados genéticamente que emplean la optimización de codones se denominan genes "humanizados" y se utilizan con frecuencia en las vacunas de ADN para mejorar la expresión.

25 La secuencia de ADN o ARN de la hemaglutinina y la neuraminidasa y la matriz y la nucleoproteína se modifica, de modo que la secuencia que codifica dichas proteínas se modifica para ser expresada de manera óptima en los seres humanos y los cerdos o el hospedador al que se ha destinado la vacuna.

30 La invención describe el uso de los nuevos genes con codones optimizados de HA y NA de la gripe A (H1N1)v en una composición inmunogénica o una vacuna de ADN y la combinación de estos nuevos genes de glicoproteínas pandémicas de H1N1 con genes pandémicos previos de H1N1 que codifican proteínas internas en una composición inmunogénica o una vacuna de ADN.

Tabla 1: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de H1N1 de los genes con codones optimizados y las proteínas que expresan.

Gen sintético de HA 1918 0607838, basado en el nº de acc.: AF117241: A/South Carolina/1/18
Nucleótido

ES 2 614 802 T3

ATGGAGGCCAGGCTGCTGGTGTGCTGTGCGCCTTGC CGCCACCAACGCCGACACCATCTGCATCGGCTACC
ACGCCAACACAGCACCGACACCGTGGATACCGTGTGCTGGAGAAGAACGTGACCGTGACCCACAGCGTGAAC
CTGCTGGAGGACAGCCACAACGGCAAGCTGTGCAAGCTGAAGGGAATCGCTCCCCTGCAGCTGGGCAAGTGC
AACATCGCCGGCTGGCTGCTGGGCAACCCCGAGTGCACCTGTGCTGACCGCCAGCAGCTGGTCTACATC
GTGGAGACCAGCAACAGCGAGAACGGCACCTGTACCCCGGCGACTTCATCGACTACGAGGAGCTGCGGGA
GCAGCTGTCCAGCGTGAGCAGCTTCGAGAAGTTCGAGATCTTCCCCAAGACCAGCTCCTGGCCCAACCACGA
GACCÁCCAAGGGCGTGACCGCCGCTGTAGCTACGCCGGAGCCAGCAGCTTCTACAGAAACCTGCTGTGGCT
GACCAAGAAGGGCAGCAGCTACCCCAAGCTGTCCAAGAGCTACGTGAACAACAAGGCAAGGAAGTGTGG
TGCTGTGGGGCGTGACCAACCCCTACCGGCACCGACAGCAGAGCCTGTACCAGAACGCCGACGCCTACG
TGAGCGTGGGCGAGCAGCAAGTACAACAGAAGGTTACCCCGGAGATCGCCGCCAGGCCAAGGTGCGCGAC
CAGGCCGGCÁGGATGAACACTACTGGACCTGCTGGAGCCCGGCGACACCATCACCTTCGAGGCCACCGGC
AACCTGATCGCCCTTGGTACGCCTTCGCCCTGAACAGGGGCAGCGGCAGCGGCATCATCACCCAGCGACGCC
CCCGTGACCGACTGCAACACCAAGTGCCAGACCCCCACGGAGCCATCAACAGCAGCCTGCCCTTCCAGAAC
ATCCACCCCGTGACCATCGCGGAGTGCSCCAAGTACGTGAGAAGCACCAGCTGAGGATGGCCACCGGCTG
AGGAACAATCCCAGCATCCAGAGCAGGGGCTGTTCGGAGCCATCGCCGATTTCATCGAGGGGGCTGGACÇ
GGCATGATCGACGGCTGGTACGGCTACCACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGCTACGCCGCCAGCCAGAA
GAGCACCCAGAACGCCATCGACGGCATCACCACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGT
TACCCGCGTGGGCAAGGAGTTCAACAACCTGGAGAGCGGATCGAGAACCTGAACAAGAAGGTGGACGAC
GGCTTCTGGACATCTGGACCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGTGCTGGAGAACGAGAGGACCTGGACTTC
CAGCAGCAACCGTGAGGAACCTGTACGAGAAGGTGAAGAGCCAGCTGAAGAACAACGCCAAGGAGATCGG
CAACGGTGTCTCGAGTCTACACAAGTQCGACGACGCCTGCATGGAGAGCGTGAGAAACGGCACCTACGA
CTACCCCAAGTACAGCGAGGAGCAAGCTGAACCGGGAGGAGATCGACGGCGTGAAGCTGGAGAGCATGG
GCGTGTACCAGATCTGGCCATCTACAGCACCGTGCCAGCAGCCTGGTGTGCTGGTGTCCCTGGGAGCCAT
CAGCTTTGGATGTGCAGCAACGGCAGCCTGCAGTGCAGGATCTGCATCTGA

Aminoácido

MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDHNGKLCCLKGIAPLQLGKCNIA
GWLLGNPECDLLLTAASSWSYIVETSNSNGTCYPGDFIDYBELREQLSSVSSFEKFEIFPKTSSWPNHETTKGVTAA
CSYAGASSFYRNLLWLTKKGSSYPKLSKSYVNNKGEVVLVWGVHHPPTGTDQQSLEYQNADAYVSVGSSKYNR
RFTPEIARPKVRDQAGRMNYWTLLPEPDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGSGIITSDAPVHDCNTKCKQTPHG
AINSSLFPQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRLMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGY

AADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA V GK EFN LERRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTD
FHDSNVRNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDDACMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGV
YQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGLQCRICI.

Gen sintético de NA 1918 0607869, basado en el nº de acc.: AF250356: A/Brevig mission/1/1918

Nucleótido

ATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCÁGCATCTGCATGGTGGTGGGCATCATCAGCCTGATCCTG
 CAGATCGGCAACATCATCAGCATCTGGGTGTCCCACAGCATCCAGACCGGCAACCAGAACCACCCCGAGACC
 TGCAACCAAGTCCATCATCACCTACGAGAAACAACACCTGGGTGAACCAGACCTACGTGAACATCAGCAACACC
 AACGTGGTGGCCGGCCAGGACGCCACCTCCGTGATCCTGACAGGCAACAGCAGCCTGTGCCCATCAGCGGC
 TGGGCCATCTACAGCAAGGACAACGGCATCAGGATCGGCAGCAAGGGCGACGTGTTCTGTGATCAGAGAGCC
 CTTATCAGCTGCAGCCACCTGGAATGCAGGACCTTCTTCTGACCCAAGGAGCCCTGCTGAACGACAAGCA
 CAGCAACGGCACCGTGAAGGACAGAAGCCCCCTACAGGACCCCTGATGAGCTGCCCGTGGGCGAGGCTCCCA
 GCCCCTACAACAGCAGATTGAGAGCGTGGCCTGGTCCGCCAGCGCCTGCCACGACGGCATGGGCTGGCTGA
 CCATCGGCATCAGCGGCCCTGACAACGGGGCCGTGGCCGTGCTGAAGTACAACGGAAATCATCACCGACACCA
 TCAAGAGCTGGCGGAACAACATCCTGAGGACCCAGGAAAGCGAGTGCGCCTGCGTGAACGGCAGCTGCTTCA
 CCATCATGACCGACGGCCCCAGCAACGGCCAGGCCAGCTACAAGATCCTGAAGATCGAGAAGGGCAAGGTG
 ACCAAGAGCATCGAGCTGAACGCCCCAACTACCACTACGAGGAATGCAGCTGCTACCCCGACACCGGCAAG
 GTCATGTGCGTGTGCAGGGACAACCTGGCACGGCAGCAACAGGCCCTGGGTGTCTTCGACCAGAACCTGGAC
 TACCAGATCGGATACATCTGCAGCGCGTGTTCGGCGACAACCCAGGCCAACGACGGCACCGGCAGCTGTC
 GGCCTGTGAGCAGCAACGGGGCCAAATGGCATCAAGGGCTTCAGCTTTCAGATACGACAACGGCGTGTGGATC
 GGCCGACCAAGAGCACCAGCAGCAGATCCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAACGGCTGGACCGAGAC
 CGACAGCAGCTTACGCGTGAAGCAGGACATCGTGGCCATCACCGACTGGTCCGGCTACAGCGGCAGCTTCGT
 GCAGCACCCCGAGCTGACCGGCCCTGGACTGCATGAGGCCCTGTTTCTGGGTGGAGCTGATCAGAGGCCAGCC
 CAAGGAGAACACCATCTGGACCAGCGGCAGCAGCATCAGCTTTTGGCGGTGAACAGCGACACCGTGGGCTG
 GTCTGGCCCGACGGGGCCGAGCTGCCCTTCAGCATCGATAAGTGA

Aminoácido

MNPNQKIITIGSICMVVGIISLILQIGNIISIWVSHSIQTGNQNHPEFCNQSIIYENNTWVNQTYVNISNTNVVAGQD
 ATSVILTGNSSLCPISGWAIYSKDNIRIGSKGDVFIREFPISCSHLECRFTFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPYRTL
 MSCPVGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGMGWLTIGISGPDNGAVAVLKYNJIITDIKSWRNILRTQESECACV
 NGSCFTIMTDGPSNQGASYKILIEKGVTKSIELNAPNYHYEECSYPTDGKVMCVCRDNWHGSRNPWWVFDQN
 LDYQIGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSSNGANGIKGFSFRYDNGVWIGRTKSTSSRSGFEMIWDPNGWETDS
 SFSVQRDIVAITDWSGYSGSFVQHELTGLDCMRPCFWVELIRGQPKENTIWTSGSSISFCGVNSDVTGWSWPDGA
 ELPFSDK.

Gen sintético de NP 1918 0607866, basado en el nº de acc.: AY44935: A/Brevig mission/1/1918

Nucleótido

ATGGCCAGCCAGGGCACCAAGAGAAGCTACGAGCAGATGGAAACCGACGGCGAGAGGCAGAACGCCACCG
 AGATCAGGGCCAGCGTGGGCAGGATGATCGGCGGCATCGGCAGGTTCTACATCCAGATGTGCACCGAGCTGA
 AGCTGTCCGACTACGAGGGCAGGCTGATCCAGAACAGCATCACCATCGAGAGGATGGTGTCTCCGCCTTCG
 ACGAGAGAAGAAAACAAGTACCTGGAAGAGCACCCAGCGCCGCAAGGACCCCAAGAAAACCGCGGACCC
 ATCTACAGAAGGATCGACGGCAAGTGGATGAGAGAGCTGATCCTGTACGACAAGGAGGAAAATCAGAAGGAT
 CTGGCGGCAGGCCAACACGGCGAGGACGCCACAGCCGGCCTGACCCACATGATGATCTGGCACAGCAACCT
 GAACGACGCCACCTACCAGAGGACAGGGCCCTCGTCAGAACCGGCATGGACCCCGGATGTGCAGCCTGAT
 GCAGGGCAGCACACTGCCAGAGAAGCGGAGCTGCTGGAGCCGCGTGAAGGGCGTGGGCACCATGGTGA

TGGAAGTGCATCAGGATGATCAAGAGGGGCATCAACGACAGGAACCTTTGGAGGGGCGAGAACCGCAGAAGG
 ACCAGGATCGCCTACGAGAGGATGTGCAACATCCTGAAGGGCAAGTTCAGACAGCCGCCAGAGGGCCAT
 GATGGACCAGGTCCGGGAGAGCAGGAACCCCGCAACGCCGAGATCGAGGACCTGATCTTCTGGCCAGAA
 GCGCCCTGATCCTGAGGGGACGCGTGGCCACAAGAGCTGCCCTGCCCGCTGCGTGTACGGACCCGCGTGG
 CCAGCGGCTACGACTTCGAGAGAGAGGGGCTACAGCCTGGTCCGATCGACCCCTTCAGGCTGCTGCAGAACT
 CCCAGGTGTACTCTGATCAGGCCAACGAGAACCCCGCCACAAGTCCAGCTGGTCTGGATGGCCTGCC
 ACAGCGCCGCTTCGAGGATCTGAGAGTGAGCAGCTTCATCAGGGGCACCAGAGTGGTGGCCAGGGGCAAGC
 TGTCACCAGGGGCGTGCAGATCGCCAGCAACGAGAACATGGAAACCATGGACAGCAGCACCTGGAAGT
 AGAAGCAGGTACTGGCCATCAGGACCAGAAGCGGCGCAACACCAACCAGCAGAGGGCCAGCGCCGACA
 GATCAGCGTGCAGCCACCTTCTCCGTGCAGAGGAACCTGCCCTTCGAGAGGGCCACCATCATGGCCGCTTC
 ACCGGCAACACCGAGGGCAGGACCAGCGACATGAGGACCGAGATCATCAGAATGATGGAAAGCGCCAGGCC
 CGAGGACGTGAGCTTCAGGGCAGGGGCGTTCGAGCTGTCGATGAGAAGGCCACCTCCCCATCGTGCC
 CAGCTTCGACATGAGCAACGAGGGCAGCTACTTCTCCGGCACAACGCCGAGGAATACGACAACCTGA

Aminoácido

MASQGTKRSYEQMETDGERQNAITEIRASVGRMIGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRN
 KYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRIDGKWMRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHMMIWHNSLNDATYQR
 TRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMVMELIRMIKRGINDRNFWRGENRRTRIA YERMC
 NILKGFQTAQRAMMDQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGPVAVASGYDFEREYSLV
 GIDPFRLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQLVVMACHSAAFEDLRVSSFIRGTRVVPKGLSTRGVQIASNENMETMD
 SSTLELRSR YWAIRTRSGNNTNQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMMESAR
 PEDVSPQGRGVFELSDEKATSPVPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN.

Gen sintético de M 1918 0607868, basado en el nº de acc.: AY130766: A/Brevig mission/1/1918

Nucleótido

ATGAGTCTTTTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCGTCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCG
 CGCAGAGACTGAAGATGTCTTTGCAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAA
 GACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTCCAGTGAGCGAGG
 ACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATCCAAATAACATGGACAGAGCAGT
 TAAACTGTACAGGAAGCTTAAAGAGGAGATAACAATCCATGGGGCCAAAGAAGTAGCACTCAGTTATCCGC
 TGGTGCAGTTCAGGCTGTATGGCCCTCATATAACAAGGATGGGGACTGTGACCACTGAAGTGGCATTGGC
 CTGGTATGCGCAACCTGTGAACAGATTGCTGATCCAGCATCGGTCTCACAGGCAAATGGTGACAACAACC
 AATCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTACTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCT
 GGATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAATGGTGACGGCGATGAG
 AACCATTTGGGACTCATCTAGCTCCAGTCTGGTCTGAAAGACGATCTTATTGAAAATTTGCAGGCCTACCAG
 AAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTG
 CACTTGATATTGTGATCTTGTATCGTCTTTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTAAAATACGGTTTAAAAAG
 AGGGCCTTCTACGGAAGGAGTCCCGGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGG
 ATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAGGCGCC

Aminoácido

Proteína M1

MSLLTEVETYVLSIVPSGLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSERGLQRR
 RFVQNALNGNDPNMDRAVKLYRKLKREITFHGAKEVALSYSAGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCAT
 CEQIADSQHRSHRQMVTNTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMGSSSEQAAEAMEVASQARQMVMQAMRTIGTHP
 SSSAGLKDDLIENLQAYQKRMGVQMQRFK.

Proteína M2

MSLLTEVETPTRNEWGCRCDNDSSDPLVIAASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRRLKYGLKRGPESTEGVPESMREEYRK
EQQSAVDVDDGHFVNIELE.

Gen sintético de HA 2009 H1N1v, basado en el nº de acc.: ACP41105: A/California/04/09

atgaaggctatcctggtggtgctgtgtacaccttcgccaccgccaacgccgatacctgtgcatcgggtaccacgccaacaacagcaccgac
accgtggtataccgtgctggaaaagaactgaccgtgaccacagcgtgaaacctgctggaagataagcacaacggcaagctgtgcaagctga
gaggcgtggcccctctgacacctgggcaagtgcaalatcggcgctggtatcctgggcaaccccagtgcgagagcctgagcaccgccaact
ctggtcctacatcgtgagacaccagcagcgacaacggcaccgtgtaccctggcgacttcafcgactacgaggaactgaggagcagctg
tccagcgtgtccagcttcgagcgttcgagatctcccaagaccagctcctggccaaccacagcagcaacaagggcgtgaccgcccctg
tcctcacgctggggccaagagcttctacaagaacctgatctggtggtgaagaagggaacagctacccaagctgtccaagagctacatca
acgacaagggaagaggtgctggtgctgtgggcatccaccacctagcaccagcggcaccagcagagcctgtaccagaacccgac
acctacgtgtcgtggcagcagccggtacagcaagaagttcaagcccagatcgcacatcagaccacaagtgccggaccaggaaggccgg
atgaactactactggaccctggtggagcccggcacaagatcaccttcgaggccaccggcaatctggtggtgcccagatacgccttcgcat
ggaaagaacccggcagcggcatcatcagcgcacccccctgacgactgcaacaccacctgtcagacccccagggggccaatcaa
caccagcctgccccttcagaacatccacccatccatcggcaagtgccctaaagtagtgtaagtcaccaagctgagactggcaccgccc
tgggaacatcccagcatccagagcagaggcctgttcggggccattgcccgtttatcagggcggtgaccggaatggtggaccggtg
gtacggctaccaccagaaatgagcagggcagcggctacggccgacctgaagtcacacagaacgccatcagagatcacaacaa
agtgaacagcgtgatcgagaagatgaacaccagttaccgctgggcaagagttcaaccacctggaagggcagcagaaactgaac
aagaaggtgagcagcggcttcctgacatctggactacaacgccagctgctggtgctgtgaaaacagcggaccctgactaccacg
actccaactgaaagatctgtacgaaagtcggagccagctgaagaacaacgcaagagatcggcaacggctgcttcgagttctaccac
aagtgcgacaacacctgtatgaaagcgtgaagaacggcacctacgactacccaagtagcagcaggaagccaagctgaaccgggaaga
gatcagcggcgtgaagctgaaagcaccggatcaccagatcctggccatctacagcaccctggccagctcactggtcctgctgtctcct
ggcgctatcagcttctggtggtgagcaacggcagcctgcagctccggtatcctgagggcggcagaattcttaattaa

Secuencia de aminoácidos

MKAILVLLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDIVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLC
KLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQ
LSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNIWLVKKGNISYPKLSKSY
INDKGKEVLVLWGIHHPSTADQQSLYQNADTYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGR
MNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAIN
TSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAFGFIEGGWTGMVDGWY
GYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNHLEKRIENLNK
KVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFY
HKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVS
LGAISFWMCNSNGSLQCRICI

Gen sintético de NA 2009 H1N1v, basado en el nº de acc.: ACP41107: A/California/04/09

atgaaccccaaccagaagatcatcaccatcggcagcgtgtgcatgaccatcggcatggccaacctgatcctgcagatcggcaacatcatcag
catctggtatcagccagcatccagctgggcaaccagaaccagatcgagacatgcaaccagagcgtgatcacctacgagaacaacacctgg
gtgaaccagacctacgtgaacatcagcaaccaactcggcctggccagagcgtggtgctgtgaaagctggccgcaacagcagcctgtg
cccctgttccggctggccatctacagcaaggacaacagcgtgctggatcggcagcaagggcgacgtgtcgtgatccgggagccctcacc
agctgcagcccctggaatgccgacctctcctgaccagggggccctgctgaacgacaagcagcaaacggcaccatcaaggacaga
agcccctaccggacctgatgagctgccccctggcgaggtgccagccctacaacagcagattcgagtcctgctggagcgcctctgc
ctgccagcagcgcataactggctgacaatcggcatcagggccctgataacggcgtgtggccgtgctgaagtacaacggcatcatcaccg
acacaatcaagagctggcgaacaacatcctcggaccaggaatccgagtgccctcgtgaaacggcagctgctcaccgtgatcaccga
cggccctagcaatggccaggccagctacaagatctccggatcgagaagggcaagatcgtgaagtcctggagatgaaccccccaactac

<p>cactacgagggaatgcagctgctaccccgacagcagcgagatcacctgtgtgcccggacaactggcacggcagcaacagaccctgggtgt ccttcaaccagaatctggaataccagatcggtctacattgcaagcggcatcttcggcgacaaccccagaccaacgacaagaccggaagctgc ggccctgtgttagcaacggggccaacggcgtgaagggttcagcttcaagtacggcaatggcgtgtggatcggccggaccaagagcatca gcagccggaaacggcttcgagatgatctgggacccaacggctggaccggcaccgacaacaacttcagatcaagcaggacatcgtgggca tcaacgagtgagcggctacagcggcagcttcgtgcagcaccctgagctgaccggcctggactgcatccggccctgctttgggtggagctg atcagaggcagaccaaagagaacaccatctggaccagcggcagcagcatcagctttgcgcggtgaacagcgacaccgtgggtgtctt ggcccgatggggccgagctgcccctcaccatcgacaagtgagggcggcggagaattcttaattaa</p>
<p>Secuencia de aminoácidos</p>
<p>MNPNQKIITIGSVCM TIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNQIETCNQSVITYENNTWVN QTYVNISNTNFAAGQSVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSKDNSVRIGSKGDVVFVIREPFISCS PLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSYNSRFESVAVSASACHD GINWL TIGISGPDNGAVA VLKYNIIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSN GQASYKIFRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSY PDSSEITCVCRDNWHGNSNRPWVSFNQ NLEYQIGYICSGIFGDNPRPNDK T GSCGPVSSNGANGVKGFSFKYNGVWIGRTKSISSRN GFEMIWDPNGWTGTDNNSFIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHP ELTGLDCIRPCFWVELIRGR PKENTIWTSGSSISFCGVNSDTV GWSWPDGAELPFTIDK</p>
<p>Gen sintético estacional de HA H3N2, basado en el nº de acc.: EU103823: A/Wisconsin/67/05</p>
<p>atgaaaaccatcatgccctgagctacatcctgtgcctgggttcgccagaagctgcccgcaacgacaacagcaccgc caccctgtgcctggccaccacgcctgccaacggcaccatcgtcaaaaccattaccaatgatcagatcagagtgacca acgccaccgagctgtgcagagcagcagcaccggcctcgcagacccccaccagatcctggacggcgagaactgc accctgatcagcctctcctcggcgaccctcagctgacggccttcagaacaagaagtgggacctgttcgtcagcgcag caaggcctacagcaactgtacccctacgacgtgccgactacggcaccctcgcctcctgtgcctccagcggcacc tggagtcaacgacgagagcttcaactggaccggcgtgaccagaacggcaccagcagcagctgcaagcggccgagcaac aacagcttctcagccgctgaactgctgaccacctgaagttcaagtaccccgcctgaacgtgacctgccaacaa tgagaaaitcgacaagctgtacatctggggcgtgaccaccccgtagcggacaacgaccagatcttctgtacgccagg ccagcggccgatcaccgtgagcaccgaagcgcagccagcagaccgtgatcccaacatcggcagcggccccaggatccg aacatccccagccgatcagatcactgaccatcgtgaagcccggcgacatcctgtgatcaactccaccggcaacct gatcggccccagggctacttcaagatccgacggcaagagcagcatcatcgcagcagccccatcgcaagtca acagcagtgatcaccaccaacggcagcatccccacagaagcccttcagaacgtgaaccgatcacctacggagcc tgtccccgtacgtgaagcagaacaccctgaaactggctaccggcatgcggaacgtgcccgagaagcagaccggggcat cttcggggccatcggcctcctcagagaacggcgtgggagggcatggtggagcgggtggtatgctccgccaccagaact ccgagggcatcggccaggcccgaccgaagagcaccagggccatcaaccagatcaacggcaagctgaaccgcctg atcggcaagaccaacgagaagttccaccagatcagaagggagtttagcaggtcagggccgatccaggacctggagaa gtactggaggacacaagatc gacctgtgagctacaacccgagctgctgctgcctggagaaccagcacaccatc acctgaccgacagcagatgaacaagctgttcgagcgcaccaagaagcagctgcgcgagaacccgaggacatggcaac ggctgttcaagatctaccacaagtcgacaacgcctgcatcggctcctccgcaacggcactacgaccagcagctgta ccgagcagggccctgaacaaccgcttccagatcaagggcgtggagctgaagagcggctacaaggactggtatctgtgga tcagcttcgctatcagctgctcctgctgtgctggtggcctcctgctggcctcctcagatggtggcctccagaagggcaacatc cgctgcaacatctgcatc</p>
<p>Aminoácido</p>

<p>MKTHIALSYILCLVFAQKLPNGDNSTATLCLGHHA VPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGGICDSPHQILDGE NCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNDESFNWTGVTQNGTSS SCKRRSNNSSFRLNWLTHLKFYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPVTDNDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQT VIPNIGSRPRIRNIPRSIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAIGKCNSECTPNGSIPNDKPFQ</p>
<p>NVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGIGQAADLKS TQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKFEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNK LFERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWLWISFA ISCFLLCVALLGFIMWACQKGNRCNICI</p>
<p>Gen sintético estacional de NA H3N2, basado en el nº de acc.: ISDN136490: A/Wisconsin/67/05</p>
<p>atgaacccaaccagaagatcatcaccatcggatccgtcagcctgaccatctccaccatctgcttttcatgcagatcgc catcctgatcaccaccgtgaccctgactcaagcagtagcagttcaacagcccccaacaaccaggtcatgctgtgcg agcccaccatcatcgagcgaacatcaccgagatcgtgtacgtgaccaacaccaccatcgagaaagagatctgccccaa ctggccgagtagccgaactggtccaagcccagtgcaatcacaggcttgcctccctcagcaaggacaacagcatccg cctgagcgtgaggggacatctgggtcaccgcgagcctacgtgagctgcgaccccacaagtgtaccagttcgccc tcggacaggggaccacactgaataacgtccacagcaacgacaccgtgcacgacgcacccccctaccgcaccctgctgatg aacgagctggcgctgcccctccactgggccaagaagcaggtctgcatcgcctggtccagcagcagctgccagcaggca ggcctgctgcacgtgtgctgaccggcgacgacaagaacgcccaccgctcatctacaacggccgctggtggaca gcatctgagctggtccaagagatctgctgcacccaagaagcaggtgctgctgcatcaacggcacctgcaccgtggtg atgaccgacggcagcctccggcaagcggacaccaagatcctgttcatcgaaggaggcaagatcgtgcacaccagcac actgtccggcagcggccagcacgtggaagagtgtagcttaccctgctggcgctgctgctgctgctgctgctgctgca actggaaggcagcaaccgcccactggtgacatcaacatcaaggactactccatctgtagcagctacgtgtagcggc ctgtgctggcagacacccccgaagaacgacagcgtcctcagcagcactgctgacccaacaagaagggcgccca cggcgtgaaaggctggccttcgacgacggcaacgacgtgtggtggccgacccatcagcagaagctgctgagcggct atgagacattcaaggtgatcgaggctgtccaacccaacagcaagctgcatcaaccgctgcttatgtgagctgat ggcaaccgctccgctacagcggcatcttcagcgtggaggcaagtctgcatcaaccgctgcttatgtgagctgat tcgggggaggaaagaagagaccgaggtctctggaccagcaacagcatctggtgttctgctggcaccagcggcacctag gcaccggcagctgcccagcggggcgacatcaacctgatgccatctga</p>
<p>Aminoácido</p>
<p>MNPNQKIIIGSVSLTISTICFFMQIAILITTVTLHFQYEFNSPPNNQVMLCEPTIERNITEIVYLTNTTIEKEICPK LAEYRNWSKQPQCNTGFAFSPKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPDKCYQFALGQGTTLNNVHSNDTVHDRTPY RTLMLNELGVPHLGTQVCIWSSSSCHDGKAWLHVCVTGDDKNATASFIYNGRLVDSIVSWSKEILRTQSEEC VCINGTCTVVMTDGASGKADTKILFIEEGKIVHTSTLSGSAQHVEECSCYPRYLGVRCVCRDNWKGSNRPVDINI KDYSIVSSYVCSGLVGDTPRKNDSSSSHCLDPNNEEGHG VKGWAFFDDGNDVWMGRTISEKLRSGYETFKVIEG WSNPNSKLQINRQVIVDRGNRSYSGIFSVGKSCINRCFYVELIRGRKEETEVLWTSNSIVVFCGTSYGTGTSWP DGADINLMI.</p>

- 5 Todos los genes naturales aplicados en las vacunas de ADN actuales están disponibles al público como secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, pero se pueden traducir en genes óptimos de ADN para vacunas mediante síntesis, utilizando codones óptimos para la expresión en mamíferos eucariotas, usando vectores de expresión convencionales (características principales: promotor de CMV, intrón A, secuencia de Kozac, gen de la vacuna incluida su secuencia de secreción, codón de parada, poliadenilación). Un gen de resistencia a kanamicina irrelevante clínicamente se incluye para el crecimiento y la selección en *E. coli* transfectadas para la producción de ADN plasmídico.
- 10 Las secuencias de aminoácidos de HA y NA de 1918 están disponibles al público (GenBank A/South Carolina/1/18 AF117241, A/Brevig Mission/1/18 AF250356) y se pueden traducir en ADN utilizando codones óptimos convencionales para la expresión en mamíferos eucariotas, utilizando vectores de expresión convencionales (características

principales: promotor de CMV, intrón A, secuencias de Kozac, gen de la vacuna incluida su secuencia de secreción, codón de parada, poliadenilación). Un gen de resistencia a kanamicina se incluye para el crecimiento y la selección en *E. coli* transfectadas para la producción de ADN plasmídico.

5 La vacunación con ADN con los genes sintéticos con codones optimizados de HA y NA de H1N1 de 1918, utilizando condiciones normales para la pistola de genes, induce una inmunidad protectora frente al virus de la gripe A circulante actual, tal y como se ejemplifica empleando una exposición al virus A/New Caledonia/20/99(H1N1) en hurones vacunados con ADN (*Mustela putorius furo*). Esto es muy sorprendente, ya que los dos virus están separados por más de 80 años de deriva antigénica y muestran una diferencia de aproximadamente el 21% en la proteína HA1. Normalmente, una vacuna de proteína protectora debe estar basada en la secuencia de aminoácidos de la cepa de gripe A estacional que circula para inducir protección. Además, la protección a través de la vacuna de ADN de 1918 frente a la cepa circulante de 2007 es más consistente que la vacuna tradicional de proteína basada en la cepa homóloga circulante (New Caledonia). Esto sugiere que la vacuna de ADN basada en 1918 induce una inmunidad protectora mucho más amplia que protege frente a cepas H1N1 de la gripe A procedentes de 1918 hasta la actualidad y quizás más allá.

15 La amplia protección inusual puede ser debida a una única secuencia de aminoácidos en las proteínas HA y/o NA de 1918 que induce anticuerpos más protectores para epítomos especiales o una inmunidad celular o un efecto adyuvante inmune, o una expresión génica particular, o una inducción inmune particular a través de la secuencia de nucleótidos optimizada de los genes particulares de H1N1 de 1918, o algunos o todos estos factores combinados.

20 Las ventajas son que un número limitado de componentes de la vacuna, administrados como una vacuna de ADN o bien como ADN o ARN desnudo como plásmido o secuencias lineales codificantes o incorporados en un virus recombinante, tienen una administración más eficaz. El descubrimiento de una amplia protección inducida por la cepa pandémica de gripe A H1N1 de 1918 puede sugerir que se puede obtener una buena protección similar frente a cepas circulantes de H2 utilizando vacunas de ADN basadas en HA y/o NA procedentes de la cepa pandémica H2N2 de 1958 y frente a cepas circulantes de H3 utilizando vacunas de ADN basadas en HA y/o NA procedentes de la cepa pandémica de 1968.

25 La inusual protección amplia y/o eficiente obtenida utilizando una cepa de la gripe A pandémica en lugar de las cepas actuales circulantes, se debe a características especiales de la secuencia del primer virus novedoso, patógeno y que se propaga. Estas características pueden aumentar gradualmente mediante la acumulación de cambios en la secuencia durante años de adaptación a la población humana y porcina.

30 Una de estas características es la acumulación de glicosilaciones ligadas a N de las glicoproteínas. Desde las primeras introducciones de las pandemias H3N2 y H1N1, las glicoproteínas han ganado varias glicosilaciones (Figura 1). Los oligosacáridos se añaden a las asparaginas (N) en la secuencia del tripéptido Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Si estas glicosilaciones ocurren en un sitio de unión antigénica o cerca del mismo, esconden los sitios de unión para el reconocimiento con los anticuerpos del hospedador. Los sitios de glicosilación en las posiciones 126 y 144 en la hemaglutinina H3 han sido variables desde 1999 en Dinamarca, estos sitios se localizan en el sitio antigénico A de HA y por lo tanto se espera que influyan en el reconocimiento con anticuerpos del hospedador. Estos sitios y otros en sitios antigénicos en HA y/o NA o cerca de los mismos se pueden eliminar para proporcionar una protección cruzada más amplia que los antígenos totalmente glicosilados.

35 Como se muestra, los virus actuales A/New Caledonia/20/99 y A/Wisconsin/67/05 comprenden más sitios N-glicosilados previstos que las cepas H1N1 o H3N2 pandémicas originales (Figura 1).

40 Una vacuna de ADN despojada de glicosilaciones en los sitios antigénicos de HA y NA o en su proximidad, inducirá un reconocimiento de subtipo más amplio.

45 La amplia protección inusual que hemos observado con vacunas de ADN basadas en cepas pandémicas es debida a las características únicas de una cepa pandémica inadaptada, por ejemplo, la capacidad de los genes pandémicos para inducir anticuerpos protectores e inmunidad celular más amplios debido a sitios antigénicos de reactividad cruzada menos enmascarados o al efecto adyuvante inmune, etc. La hemaglutinina del virus de la gripe acumula glicosilaciones y, por lo tanto, camufla sus sitios antigénicos para el reconocimiento por el sistema inmune del hospedador. La buena protección cruzada observada mediante la aplicación de los genes pandémicos en la vacuna de ADN contra la gripe, se explica en parte por los pocos sitios de glicosilación en estos genes, que sugerimos en el análisis en la siguiente Tabla:

50

Asparaginas previstas para ser N-glicosiladas ^a

Posición de aminoácidos	HA H1N1 1918	HA H1N1 1999	HA H1N1v 2009	HA H3N2 1968	HA H3N2 2005
	11	11	11	8	8
23	23	23	22	22	
87	87	87	38	63	
287	125	287	81	133	
481*	154	481*	165	144	
540*	286 (287)	540*	285	165	
	480* (481)		483*	246	
	539* (540)			285	
				483*	

^a La numeración de los aminoácidos se deriva de H1N1 y H3N2, respectivamente.

* Posiciones también previstas positivamente; sin embargo, los secuencias están situados en la región HA2, no es probable que estén glicosilados.

5 Las glicoproteínas pandémicas de una pandemia actual, ya sea solas o en combinación con genes pandémicos anteriores o genes del virus de la gripe estacional en una vacuna de ADN, inducirán una protección óptima contra el virus pandémico actual y las versiones siguientes del mismo subtipo sometidas a deriva.

10 La secuencia de ADN o ARN de la hemaglutinina y la neuraminidasa, por ejemplo, procedente de cepas estacionales no pandémicas, puede cambiar de modo que la secuencia que codifica dichas proteínas se modifica para codificar dichas proteínas con menos sitios de glicosilación o ninguno.

Las ventajas son que un número limitado de componentes de la vacuna administrados como una vacuna de ADN o bien como ADN o ARN desnudo, como un plásmido, o secuencias codificantes lineales, o incorporados en virus recombinantes, o una formulación a base de lípidos, tienen una administración más eficaz.

15 La vacuna de ADN contra la gripe A estacional universal debe comprender las glicoproteínas HA y/o NA de H1N1 procedentes de la pandemia más reciente de H1N1, glicoproteínas HA y/o NA de H3N2 procedentes de la última pandemia de H3N2 y/o la epidemia más reciente junto con los genes que codifican los genes internos. Los genes internos de NP y/o M procedentes de una de las pandemias, por ejemplo, H1N1 de 1918 que ha mostrado protección en nuestro modelo animal.

20 La estructura artificial de ADN utilizada es un plásmido WRG7079 modificado (Backbone MVLF #1528). Nuestros genes sintéticos de la gripe con codones optimizados para los seres humanos, se han insertado entre los sitios de restricción Kas1 y Mlu1 en el vector de expresión.

Tabla 2: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de H3N2 y H2N2 de los genes (sin optimización de codones).

HA H3N2 nº de acc.: AB295625: A/Aichi/2/1968(H3H2)
Nucleótido
ATAATTCTATTAATCATGAAGACCATCATTTGCTTTGAGCTACATTTTCTGTCTGGCTCTCGGCCAAGACCTTCCA GGAAATGACAACAGCACAGCAACGCTGTGCCTGGGACATCATGCGGTGCCAAACGGAACACTAGTGAAAACAATC ACAGATGATCAGATTGAAGTGACTAATGCTACTGAGCTAGTTCAGAGCTCCTCAACGGGGAAAATATGCAACAAT CCTCATCGAATCCTTGATGGAATAGACTGCACACTGATAGATGCTCTATTGGGGGACCCTCATTGTGATGTTTTT CAAAATGAGACATGGGACCTTTTCGTTGAACGCAGCAAAGCTTTCAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCAGAT TATGCCTCCCTTAGGTCAGTGTGCTCGTCAGGCACTCTGGAGTTTATCACTGAGGGTTTCACTTGGACTGGG GTCACTCAGAATGGGGGAAGCAATGCTTGCAAAAAGGGGACCTGGTAGCGGTTTTTTCAGTAGACTGAACTGGTTG ACCAAATCAGGAAGCACATATCCAGTGCTGAACGTGACTATGCCAAACAATGACAATTTTGACAAACTATACATT TGGGGGGTTACACCACCCGAGCACGAACCAAGAACAACCAGCCTGTATGTTCAAGCATCAGGGAGAGTACAGATC TCTACCAGGAGAAGCCAGCAAACTATAATCCCGAATATCGAGTCCAGACCCTGGGTAAGGGGTCTGTCTAGTAGA ATAAGCATCTATTGGACAATAGTTAAGCCGGGAGAGCTACTGGTAATTAATAGTAATGGGAACCTAATCGCTCCT CGGGGTTATTTCAAAATGCGCACTGGGAAAAGCTCAATTAATGAGGTCAGATGCACCTATTGATACCTGATTTTCT

GAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAGCCCTTTCAAACGTAACAAGATCACATATGGAGCA
 TGCCCAAGTATGTTAAGCAAAACACCCTGAAGTTGGCAACAGGGATGCGGAATGTACCAGAGAAACAACTAGA
 GGCCTATTCGGCGCAATAGCAGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGATAGACGGTTGGTACGGTTTCAGG
 CATCAAAATTCAGGGGCACAGGACAAGCAGCAGATCTTAAAAGCACTCAAGCAGCCATCGACCAAAATCAATGGG
 AAATTGAACAGGGTAATCGAGAAGACGAACGAGAAAATCCATCAAATCGAAAAGGAATTCTCAGAAGTAGAAGGG
 AGAATTCAGGACCTCGAGAAAATACGTTGAAGACACTAAAAATAGATCTCTGGTCTTACAATGCGGAGCTTCTTGT
 GCTCTGGAGAATCAACATACAATTGACCTGACTGACTCGGAAAATGAACAAGCTGTTTGAACAAAACAGGAGGCAA
 CTGAGGGAAAATGCTGAAGACATGGGCAATGGTTGCTTCAAAAATATACCACAAATGTGACAACGCTTGCATAGAG
 TCAATCAGAAAATGGGACTTATGACCATGATGTATACAGAGACGAAGCATTAAACAACCGTTTCAGATCAAAGGT
 GTTGAAGTGAAGTCTGGATACAAAGACTGGATCCTGTGGATTTCTTTGCCATATCATGCTTTTGTGTTGT
 GTTTGCTGGGGTTTCATCATGTGGGCTGCCAGAGAGGCAACATTAGGTGCAACATTGCAATTTGAGTGTATTAG
 TAATTA

Aminoácido

MKTHIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKT
 ITDDQIEVTNATELVQSSSTGKICNNPHRLDGIDCTLIDALLGDPHCDVPFQNETWDL
 FVERSKAFSNCPYYPDVPDYASLRSLVASSGTFLEFITEGFTWTGVTQNGGNSACKRGP
 SGFFSRLNWLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVVHPSTNQEQTSLYVQASGRV
 TVSTRRSQQTHIPNIESRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKM
 RTGKSSIMRSDAPIDTCSICITPINGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLAT
 GMRNVPEKQTRGLFGAIAFGIENGWEGMIDGWYFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQ
 INGKLNRIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQ
 HTIDLTDSEMNKLFKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYR
 DEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQRGNIRCNIC

NA H3N2 nº de acc.: AB295606: A/Aichi/2/1968(H3H2)

Nucleótido

GAAAATGAATCCAAATCAAAGATAATAACAATTGGCTCTGTCTCTCACCATTGCAACAGTATGCTTCCTCAT
 GCAGATTGCCATCCTGGTAACTACTGTAACATTGCATTTAAGCAATATGAGTGCAGTCCCCCGAGCAACCA
 AGTAATGCCGTGTGAACCAATAATAATAGAAAGGAACATAACAGAGATAGTGTATTTGAATAACACCACCATAGA
 GAAAGAGATATGCCCAAAGTAGTGAATACAGAAAATGGTCAAAGCCGCAATGTCAAATTACAGGATTTGCACC
 TTTTCTAAGGACAATTCAATCCGGCTTTCTGCTGGTGGGGACATTTGGGTGACGAGAGAACCTTATGTGTCATG
 CGATCATGGCAAGTGTATCAATTTGCACTCGGGCAGGGGACCACACTAGACAACAAACATTCAAATGACACAAT
 ACATGATAGAAATCCCTCATCGAACCTATTAATGAATGAGTTGGGTGTTCCATTTCAATAGGAACCAGGCAAGT
 GTGTATAGCATGGTCCAGCTCAAGTTGTACGATGGAAAAGCATGGCTGCATGTTTGTATCACTGGGGATGACAA
 AAATGCAACTGCTAGCTTCAATTTATGACGGGAGGCTTGTGGACAGTATTGGTTCATGGTCTCAAAATATCCTCAG
 AACCCAGGAGTCGGAATGCGTTTGTATCAATGGGACTTGCACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCTTCAGGAAG
 AGCCGATACTAGAAATACTATTGATGAAGAGGGGAAAATGTCCATATTAGCCATTGTCAGGAAGTGCTCAGCA
 TGTAGAAGAGTGTCTCTGTTATCCTAGATATCCTGGCGTCAGATGTATCTGCAGAGACAACCTGGAAGGCTCTAA
 TAGGCCCGTCGTAGACATAAATATGGAAGATTATAGCATTGATTCCAGTTATGTGTGCTCAGGGCTTGTGGCGA
 CACACCTAGAAAACGACGACAGATCTAGCAATAGCAATTGCAGGAATCCTAATAATGAGAGAGGGAATCAAGGAGT
 GAAAGGCTGGGCCTTTGACAATGGAGATGACGTGTGGATGGGAAGAACGATCAGCAAGGATTTACGCTCAGGTTA
 TGAAACTTTCAAAGTCATTGGTGGTTGGTCCACACCTAATCCAAATCGCAGATCAATAGACAAGTCATAGTTGA
 CAGCGATAATCGGTCAGGTTACTCTGGTATTTTCTGTGTGAGGGCAAAGCTGCATCAATAGGTGCTTTTATGT
 GGAGTTGATAAGGGGAAGGAAACAGGAGACTAGAGTGTGGTGGACCTCAAACAGTATTGTGTGTTTTGTGGCAC
 TTCAGGTACCTATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGGGGCGAACATCAATTTTCATGCCTATATAAGCTTTGCAAT
 TTTAGA

Aminoácido

NA H3N2 nº de acc.: AB295606: A/Aichi/2/1968(H3H2)

Nucleótido

MNPNQKIITIGSVSLTIATVCFMQIAILVTTVTLHFKQYECDS
 PASNQVMPCEPIIIERNITEIVYLNNTTIEKEICPKVVEYRNWSKPQCQITGFAPFSK
 DNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDHGKCYQFALGQGTLDNKHSNDTIHDRIPIHRTLLM
 NELGVPFHLGTRQVCIAWSSSSCHDGKAWLHVCITGDDKNATASFIYDGRLVDSIGSW
 SQNILRTQESEVCINGTCTVVMTDGSASGRADTRILFIEEGKIVHISPLSGSAQHVE
 ECSCYPRYPGVRICRDNWKGSRPVDINMEDYSIDSSYVCSGLVGDTPRNDRSSN
 SNCRNPNNERGNQGVKGFWDNGDDVWMGRTISKDLRSGYETFKVIGGWSTPNSKSQI
 NRQVIVSDNRSYGIFSVEGKSCINRCFYVELIRGRKQETRVVWTSNSIIVVFCGTS
 GTYGTGSWPDGANINFMPI

HA H3N2 nº de acc.: CY022013: A/Albany/20/1957(H2H2)

Nucleótido

ATAGACAACCAAAAGCAAAACAATGGCCATCATTATCTCAITTCCTGTTACAGCAGTGAGAGGGGACCAGAT
 ATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACAGAGAAGGTCGACACAATCTAGAGCGGAACGTCCTGTGACTCA
 TGCCAAGGACATTCTTGAGAAGACCATAACGGAAAGTTATGCCAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAAGTGG
 GGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGAAAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGTCCTA
 TATAATGGAGAAAAGAAAACCCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTGAAGAATTGAAACA
 TCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTCGAGAAAAGTAAAGATTCTGCCAAAGATAGATGGACACAGCATAACAACA
 TGGAGGTTTACGGGCTCGCGGTGTCTGGTAATCCATCATTCTCAGGAACATGATCTGGCTGACAAAGAAAGG
 ATCAAATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAGAACAATGCTAATAATTTGGGGGGTGCA
 CCATCCCAATGATGAGACAGAACAAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCACATCAAC
 ATTGAAACAAAAGGTCAACCCAGACATAGCAACAAGGCCTAAAAGTGAATGGACTAGGAAGTAGAATGGAATTCTC
 TTGGACCCCTATTGGATATGTGGGACACCATAAATTTTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAGATATGGATT
 CAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAGAAAGAACACTTGGGAACCTGTGAGACCAAATGCCA
 AACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTGCCTTTTACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCCCCAA
 ATATGTAAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCCAGATTGAATCAAGAGGATTGTT
 TGGGGCAATAGCTGGTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACAGCAA
 TGACCAGGGATCAGGGATGCGACGGGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCATTTGATGGAATCACCACAAGGTAAA
 TTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAATTTGAAGCTGTTGGGAAAGAATTCAGTAACCTAGAGAGAAGACTGGA
 GAACCTGAACAAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATAAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGA
 AAATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAAAGTCAGAATGCAGCTGAGAGA
 CAACGTCAAAGAAGTGAAGTGGATGTTTGAATTTATCACAATGTGATGATGAATGCATGAATAGTGTGAA
 AAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAAACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAAAATT
 GAGCAGCATGGGGTTTATCAAACTCCTTGCCATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATGAT
 GGCTGGGATCTCTTCTGGATGTGCTCCAACGGGTCTGTCAGTGCAGGATCTGCATATGATTATAAGTCATTTT
 ATAATTA

Aminoácido

MAIHYLJLLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDILERNVTVTHA
 KDILEKTHNGKLCCKLNGIPPELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRD
 GLCYPGPFNDYEELKHLSSVKHFEKVKILPKDRWQHTTTGGSRACAVSGNPSFFRN
 MIWLTKKGSNYPVAKGSYNNISGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVTGYVSVGTST
 LNKRSTPDIAATRPKVNLGSRMEFSWTLDMWDITINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSS
 GIMKTEGLTGNCEKTCQTPLAGAINTLPPHNVHPLTIGCEPKYVKSEKLVLATGLRNV
 PQIESRGLFGLAIGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFDGITNKV

<p>NSVIEKMNTQFEAVGKEPSNLERRLENLNKKMEDGFLDVWVYNAELLVLMENERTLDF HDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKL NRNEIKGVKLSMGMVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI</p>
<p>NA H2N2 nº de acc.: CY022015: A/Albany/20/1957(H2H2)</p>
<p>Nucleótido</p>
<p>TGAAAATGAATCCAAATCAAAGATAATAACAATTGGCTCTGTCTCTCTCACCATTGCAACAGTATGCTTCCTCA TGCAGATTGCCATCTGGCAACTACTGTGACATTGCATTTTAAACAACATGAGTGCGACTCCCCGCGAGCAACC AAGTAATGCCATGTGAACCAATAATAATAGAAAGGAACATAACAGAGATAGTGTATTGAATAACACCACCATAG AGAAAGAGATTTGCCCGAAGTAGTGAATACAGAAATTGGTCAAAGCCGCAATGTCAAATTACAGGATTGTCAC CTTTTTCTAAGGACAATTCAATCCGGCTTTCTGCTGGTGGGGACATTTGGGTGACGAGAGAACCTTATGTGTCAT GCGATCTGGCAAGTGTATCAATTTGCACTCGGGCAAGGGACCACACTAGACAACAACATTCAAATGGCACAA TACATGATAGAATCCCTCACCAGAACCTATTAATGAATGAGTTGGGTGTTCCATTTCAATTAGGAACCAACAAG TGTGTGTAGCATGGTCCAGCTCAAGTTGTCACGATGGAAAAGCATGGTTCATGTTGTGTCAGTGGGATGATA GAAATGCGACTGCCAGCTTCATTTATGACGGGAGGCTTGTGGACAGTATTGGTTCATGGTCTCAAAAATATCCTCA GGACCCAGGAGTCCGAATGCGTTTGTATCAATGGGACTTGCACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAA GAGCCGATACTAGAATACTATTCATTAAGAGGGGAAAATTGTCCATATCAGCCCATGTCAGGAAGTGTCTCAGC ATATAGAGGAGTGTCTCTGTTACCTCGATATCCTGACGTCAGATGTATCTGCAGAGACAACCTGGAAAGGCTCTA ATAGGCCCGTTATAGACATAAATATGGAAGATTATAGCATTGATTCAGTTATGTGTGCTCAGGGCTTGTGGCG ACACACCCAGGAACGACGACAGCTCTAGCAATAGCAATTGACGGGATCCTAACAATGAGAGAGGGAATCCAGGAG TGAAAGGCTGGGCTTTGACAATGGAGATGATGTATGGATGGGAAGAACAATCAACAAGATTACGCTCAGGTT ATGAAACTTTCAAAGTATTGGTGGTTGGTCCACACCTAATCCAAATCGCAGGTCAATAGACAGGTCATAGTTG ACAACAATAATTGGTCTGGTTACTCTGGTATTTCTCTGTTGAGGGCAAAAGCTGCATCAATAGGTGCTTTTATG TGGAGTTGATAAGGGGAAGGCCACAGGAGACTAGAGTATGGTGGACCTCAAACAGTATTGTTGTGTTTTGTGGCA CTTCAGGTACTTATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGGGGCAACATCAATTCATGCCTATATAAGCTTTCGCAA TTTTAGAAAA</p>
<p>Aminoácido</p>
<p>MNPNQKIITIGSVSLTIATVCFMLQIAILATTVTLHFKQHECDS PASNQVMPCEPIIERNITEIVYLNNTTIEKEICPEVVEYRNWSKQCCQITGFAPFSK DNSIRLSAGGDWVTRPYYVSCDPGKCYQFALGQGTLDNKHSHNGTIHDRIPHRTLLM NELGVPFHLGKQVCVAWSSSSCHDGKAWLHVCVTGDDRNASFIYDGRLVDSIGSW SQNILRTQESECVCINGTCTVVMTDGSASGRADTRILFIKEGKIVHISPLSGSAQHIE ECSCYPRYPDVRCICRDNWKGSRNPVIDINMEDYSIDSSVYVCSGLVGDTPRNDSSSN SNCRDPNNERGNPGVKGWAFDNGDDVWMGRTINKDSRSGYETFVIGGWSTPNKSKQV NRQVIVDNNWSGYSGIFSVGKSCINRCFYVELIRGRPQETRVVWTSNSIVFCGTSGYGTGSWPDGANINFMPI</p>

5 Para investigar adicionalmente el principio de una vacuna de ADN pandémica, hemos diseñado una vacuna de ADN basada en los genes pandémicos de HA y NA del virus H3N2 de la gripe de Hong Kong de 1968. Una vez más, la vacuna de ADN pandémica inducía protección frente a una infección con el virus H3N2 contemporáneo. Se observó un aclaramiento más rápido del virus y niveles elevados de anticuerpo contra la cepa expuesta.

Nucleótidos y proteínas incluidas en la presente invención:

Nucleótidos y proteínas	SEQ ID NO
ADN sintético de HA de H1N1 de 1918	1
Proteína de HA de H1N1 de 1918	2
ADN sintético de NA de H1N1 de 1918	3
Proteína de NA de H1N1 de 1918	4
ADN sintético de NP de H1N1 de 1918	5

Nucleótidos y proteínas	SEQ ID NO
Proteína de NP de H1N1 de 1918	6
ADN sintético de M de H1N1 de 1918	7
Proteína M1 de H1N1 de 1918	8
Proteína M2 de H1N1 de 1918	9
ADN sintético de HA de H1N1v de 2009	10
Proteína de HA de H1N1v de 2009	11
ADN sintético de NA de H1N1v de 2009	12
Proteína de NA de H1N1v de 2009	13
ADN sintético estacional de HA de H3N2	14
Proteína estacional de HA de H3N2	15
ADN sintético estacional de NA de H3N2	16
Proteína estacional de NA de H3N2	17

Leyendas de las Figuras

5
 Figura 1: Sitios de N-glicosilación previstos en la proteína hemaglutinina. Secuencias N-glicosiladas previstas en HA de los virus pandémicos a) H1N1 de 1918 (A/South Carolina/1/18(H1N1)) y b) H3N2 de 1968 (A/Aichi/2/1968(H3N2)) en comparación con los virus actuales c) H1N1 (A/New Caledonia/20/99(H1N1)) y d) H3N2 (A/Wisconsin/67/05) por encima del valor umbral de 0,5.

10
 Figura 2: Resultados iniciales de la valoración de anticuerpos IgG y virus después de la vacuna de ADN de H1N1. Los hurones se vacunaron como en el ejemplo 2 con ADN vírico con codones optimizados de HA+NA de H1N1 de 1918 y de HA+NA+NP+M de H1N1 de 1918 o de HA+NA sin codones optimizados de H1N1 de 1999 actual y se expusieron a un virus de 1947. (A) Respuesta media de anticuerpos IgG específicos en suero (ELISA) en hurones frente a la gripe A de A/New Caledonia/20/99(H1N1), días después de la exposición vírica y (B) número de copias de ARN vírico (RT/PCR en tiempo real) en lavados nasales, días después de la exposición. Seis hurones en cada grupo.

15
 Figura 3: Hurones vacunados con ADN de HA+NA de H1N1 pandémico de 1918 expuestos al virus circulante H1N1 de 1999 de la temporada 2007. (A) Fiebre 2 días después de la exposición; (B) pérdida de peso corporal el día 4 después de la exposición; (C) valoración del virus en lavados nasales el día 7 después de la exposición; (D) puntuación clínica de la enfermedad basada en una tabla de puntuación para estornudos, secreción nasal y nivel de actividad.

20
 Figura 4: Hemoadsorción como medida de la expresión de la proteína funcional en células de mamífero de HA con codones optimizados procedente de H1N1 de 1918 (HA 1918), H5N7 aviar (HA H5N7) y H3N2 de 1968 (HA H3N2), en comparación con H1N1 de 1918 sin optimización de codones (HA NC).

Figura 5: Valoración del virus H3N2 de 2007/08 en lavados nasales de hurones vacunados con ADN de H3N2 de 1968 o ADN de H3N2 de 2005 (temporada en circulación 2007/8).

25
 Figura 6: Anticuerpos IgG específicos de virus de la gripe A H3N2 de 2007/08 en sueros de hurón después de la exposición.

Figura 7: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación frente a A: virus H3N2 de 1968 (A/Aichi/2/68) y B: de 2007/08 (A/Wisconsin/67/05).

Figura 8: Valoración del virus H1N1 de 2007 en lavados nasales de hurón después de una infección con A/New Caledonia/20/99.

30
 Figura 9: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación frente al virus A/New Caledonia/20/99(H1N1).

Figura 10: Anticuerpos IgG específicos de la gripe H1N1 de 2007 (A/New Caledonia/20/99) en sueros de hurón después de la exposición.

35
 Figura 11: La vacuna de ADN de H1N1v pandémico en cerdos aclara una infección del virus H1N1 porcino estacional. Los cerdos fueron vacunados tal como se describe en el ejemplo 15, y la TCID50/ml de virus se calculó basándose en una curva estándar de concentraciones conocidas.

Figura 12: La vacuna de ADN de H1N1v pandémico en cerdos induce anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación que se desencadena con el virus estacional porcino H1N1 de 1993. Los anticuerpos HI contra la pandemia humana de H1N1v de 2009 se midieron como se describe para los estudios de hurones en el ejemplo 4b

5 Figura 13: La vacuna de ADN de H1N1v pandémico en cerdos evita la fiebre después de una exposición a un virus H1N1 porcino estacional de 1993. La fiebre después de la infección con el virus A/Cerdo/Dinamarca/19126(H1N1) se midió todos los días después de la exposición.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de los vectores de expresión

10 Los genes de la vacuna de ADN contra la gripe fueron diseñados a partir de secuencias de nucleótidos publicadas en GenBank (Tabla 1). Los genes se prepararon de forma sintética y se diseñaron para incluir las enzimas de restricción apropiadas y la secuencia de Kozak (GCCACC), base -1 aguas arriba del codón de inicio, para una clonación y transcripción eficaces en el vector de expresión WRG7079 (PowderJect, Madison, WI). Los genes se sintetizaron utilizando solo codones procedentes de genes humanos/hurones altamente expresados 5 (codón optimizado). De este modo, los codones de nucleótidos se alteran (humanizan), pero los aminoácidos codificados son idénticos a los codificados por el ARN vírico. Los genes se clonaron adicionalmente de forma individual en el vector de expresión WRG7079 o el vector pKCMV. Los elementos clave en los vectores de expresión son un gen de resistencia a kanamicina, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, el intrón A y una señal de poliadenilación. La secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (tPA) en el vector de expresión WRG7079 original, utilizada para dirigir las proteínas a una vía secretora, se escindió a favor de la secuencia señal de la gripe localizada en los genes de HA y NA de 1918. Se quería aplicar el mismo vector para la expresión de los genes internos NP y M1 que no tenían señales de secreción y que se encuentran de forma natural en el interior del virus y en el interior de las células infectadas, por lo tanto, se eliminó la señal de secreción tPA de WRG7079.

25 Los genes procedentes del virus A/New Caledonia/20/99(H1N1) aplicados en la primera línea de experimentos, no se diseñaron de forma sintética o con codones optimizados. El ARN vírico del virus A/New Caledonia/20/99(H1N1) cultivado en células MDCK se aisló mediante el minikit de ARN vírico QIAamp® (QIAGEN, Hilden, Alemania) y la RT-PCR se realizó como se ha descrito previamente en 2 mediante el kit de RT-PCR OneStep® (QIAGEN). Los cebadores se diseñaron para amplificar el gen que codificaba HA y NA. Se incluyeron en los cebadores los mismos sitios de restricción y la secuencia de Kozak que para las estructuras artificiales de H1N1 de 1918 (HA NC F: 5'-caacgcgtgccaccatgaaagcaaaactactgg-3', HA NC R: 5'-tcggcgcctcagatgcatattctactcgc-3', NA NC F: 5'-caacgcgtgccaccatgaatccaaatc-3', NA NC R: 5'-tcg gcgccctacttgcaatgggtgaa cggc-3'). Los productos de la RT-PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa mediante el kit de ADN de PCR y purificación de bandas en gel GFX® (Amersham Biosciences, Piscataway, EE.UU.) antes de la secuenciación.

35 Los productos de la PCR purificados se secuenciaron directamente. La reacción de secuenciación se realizó mediante el kit de secuenciación ABI PRISM® BigDye® Terminators v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) como se ha descrito previamente (2). El desarrollo de las secuencias se realizó en un analizador genético automático ABI PRISM® 3130 (Applied Biosystems) con capilares de 80 cm. Las secuencias de consenso se generaron en la versión 2.5 del programa informático SeqScape® (Applied Biosystems). El ensamblaje de la secuencia, la alineación múltiple y el recorte de la alineación se realizaron con el programa informático BioEdit v.7.0.5.9. Los productos de la PCR se digirieron adicionalmente con enzimas de restricción y se clonaron en el vector de expresión WRG7079 en bacterias DH5α. La purificación del ADN exento de endotoxinas de los clones de vacunas se preparó mediante el kit EndoFree Plasmid Giga (QIAGEN). Todos los insertos y los clones de las vacunas se secuenciaron como control.

Ejemplo 2: Inmunizaciones y exposición

45 En la primera línea de experimentos con vacunas de ADN de H1N1, los hurones (*Mustela putorius furo*), de aproximadamente siete meses de edad, se dividieron en grupos mediante el uso de una identificación con chips marcadores para perros (E-vet, pet-id, Haderslev, Dinamarca), con cinco a seis animales en cada grupo. Todos los animales se mantuvieron agrupados y se alimentaron con una dieta convencional con comida y agua a voluntad. Los animales estaban alojados de acuerdo con la Ley Danesa de Experimentación Animal y se mantuvieron en instalaciones con nivel de bioseguridad II en la Facultad de Ciencias de la Vida, Copenhague. El período de aclimatación fue de nueve días.

50 Cuatro grupos de seis hurones se vacunaron del modo siguiente; (1) vacunado con ADN plasmídico de HA (gen con codones optimizados) y NA (gen con codones optimizados) de H1N1 de 1918, (2) vacunado con ADN plasmídico de HA, NA, NP y M (todos con codones optimizados) de H1N1 de 1918, (3) vacunado con plásmido vacío (control de vacuna negativo) y (4) vacunado con ADN plasmídico de HA y NA (sin codones optimizados) de A/New Caledonia/20/99(H1N1) (vacuna de control positivo). Los hurones se expusieron a 1×10^7 TCID₅₀ de virus A/Fourth Mounth/1/47(H1N1)

Para investigar la protección frente a la exposición a un virus H1N1 contemporáneo, en comparación con la vacuna convencional, en un segundo experimento, cinco grupos de cinco animales se vacunaron del modo siguiente: (1)

vacunado con ADN de HA y NA de H1N1 de 1918, (2) vacunado con ADN de HA y NA de A/New Caledonia/20/99(H1N1), (3) vacunado con ADN de NP y M de H1N1 de 1918, (4) vacuna de proteína trivalente convencional (Influvac, Solvay Pharmaceuticals), (5) vacunado con plásmido vacío (control de vacuna negativo). Estos animales recibieron dos inyecciones de la vacuna de ADN para cada vacunación y se expusieron a 1×10^7 TCID₅₀ de virus A/New Caledonia/20/99.

Para comparar la protección de los hurones vacunados con ADN de 1918, con hurones sin tratar no sometidos previamente a experimentación en el tercer experimento, dos grupos de cinco animales se vacunaron del modo siguiente: (1) vacunado con ADN de HA y NA de H1N1 de 1918, (2) animales no vacunados no sometidos previamente a experimentación. Los animales vacunados con ADN en este experimento recibieron cuatro inyecciones de la vacuna de ADN para cada vacunación. Los hurones se expusieron a 1×10^7 TCID₅₀ de virus A/New Caledonia/20/99.

Para evaluar la vacuna de ADN de H3N2 pandémico frente a virus H3N2 actuales, los hurones se dividieron en cuatro grupos, con seis animales en cada grupo. Los grupos se vacunaron del modo siguiente: (1) vacuna de ADN de HA y NA de H3N2 de 1968, (2) vacuna de ADN de HA y NA de H3N2 de 2007/08 (A/Wisconsin/67/05(H3N2)), (3) vacuna de proteína trivalente convencional (Influvac), (4) animales no vacunados no sometidos previamente a experimentación. Los animales vacunados con ADN en este experimento recibieron cuatro inyecciones de la vacuna de ADN para cada vacunación y se expusieron a 1×10^7 TCID₅₀ de virus A/Wisconsin/67/05(H3N2).

Las vacunas mixtas de ADN de HA y NA se administraron en dos inyecciones y las vacunas mixtas de ADN de NP y M se administraron en dos inyecciones. Por lo tanto, los grupos que recibieron solo la vacuna de ADN de HA y NA fueron inyectados adicionalmente dos veces con ADN de plásmido vacío, asegurando que todos los animales habían recibido la misma cantidad de ADN y el mismo número de inyecciones.

Los hurones fueron inoculados con pistola de genes (Helios, Bio-Rad, Hercules, CA) (27,5 bar (400 psi) de helio comprimido) en la piel abdominal afeitada, usando partículas de oro recubiertas con 2 µg de ADN plasmídico (partículas con un tamaño de 1,6 µm), eficacia del recubrimiento del 80-95% en cada disparo. Cada hurón recibió cuatro disparos, tres veces cada dos semanas. Los hurones fueron expuestos 10-14 días después de la tercera inmunización a 1×10^7 TCID₅₀/ml de cualquier virus entre A/Fouth Mounth/1/47(H1N1), A/New Caledonia/20/99(H1N1) o A/Wisconsin/65/2005(H3N2) en 100 µl de PBS administrados en las fosas nasales con una jeringa. El suero sanguíneo se recogió de forma secuencial después de la exposición, desde la vena cava de animales anestesiados (tiletamina/zolazepam (mezcla de zoletil para gatos)). Los animales se sacrificaron con pentobarbital.

Ejemplo 3: Ensayo cuantitativo de RT-PCR en tiempo real para el virus de la gripe A.

El día de la recogida de suero sanguíneo, las fosas nasales de cada hurón se lavaron con 1 ml de PBS y el lavado se congeló inmediatamente para el análisis mediante RT-PCR en tiempo real. Se extrajeron doscientos microlitros de lavado nasal en un instrumento automatizado MagNA Pure LC, aplicando el kit de aislamiento de ácido nucleico total de MagNA Pure LC (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). El material extraído se eluyó en 200 µl de H₂O Milli-Q. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con secuencias de oligonucleótidos como describen Spackman et al., (23). El material extraído (5 µl) se añadió a 20 µl de mezcla maestra que consistía en 10 nM de cada cebador y 2 nM de la sonda Taqman marcada con FAM en el extremo 5' y extintor de la fluorescencia "black hole" 1 en el extremo 3', junto con los reactivos del kit de RT-PCR de OneStep[®] (QIAGEN, Hilden, Alemania), de acuerdo con el fabricante. Las secuencias diana se amplificaron en el sistema MX3005 de Stratagene con el siguiente programa: 20 min a 50°C, 15 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 55°C. El contenido en genomas víricos en las muestras se determinó utilizando una curva estándar, desarrollada mediante amplificación de la dilución del virus H1N1 o H3N2 con una concentración conocida.

Ejemplo 4: Anticuerpo en suero determinado por ELISA

Placas de ELISA (96 pocillos) se recubrieron con 100 µl de vacuna de la gripe dividida (Vaxigrip 2007-08 o Iruflac 2006-07) diluida 1:100 en NaHCO₃ 35 mM pH 9,6 y Na₂CO₃ 15 mM, durante una noche a 4°C. Los pocillos se bloquearon con 1% de PBS/BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con 0,05% de PBS/Tween (PBST). Los sueros se diluyeron 1:100 en 0,1% de BSA/PBST dos veces en la placa y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 µl de IgG de conejo biotinilada anti-hurón, diluidos 1:250 durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron, y se incubaron con 100 µl de peroxidasa de rábano (HRP) con estreptavidina 1:1000 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Después de 30 minutos, se lavaron las placas y se añadieron 100 µl de peróxido de hidrógeno con OPD. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 0,5 M y se leyó a DO492 nm.

Ejemplo 4C: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

Los sueros de hurón se trataron con la enzima que destruye el receptor (RDE(II), Seiken, Japón) como describe el fabricante. Una parte del suero de hurón se adsorbió en sangre con 20 partes de glóbulos rojos concentrados de sangre de cobaya y se incubó durante una hora a 4°C, seguido de centrifugación. Los virus se valoraron mediante un ensayo de hemaglutinación, de acuerdo con los protocolos de la OMS [9] con 0,75% de glóbulos rojos de cobaya en placas con fondo en U (placas U96 MicroWell, Nunc) y se incubaron durante una hora. El virus fue normalizado a un criterio de valoración del 100% de hemaglutinación de 8 unidades de hemaglutinación (HAU). El ensayo de in-

hibición de la hemaglutinación (HI) se realizó de acuerdo con los protocolos de la OMS [9] con 0,75% de glóbulos rojos de cobaya en placas con fondo en U de 96 pocillos (placas U96 MicroWell, Nunc) y las valoraciones de HI se leyeron como las recíprocas de la última dilución de los sueros que inhibían completamente la hemaglutinación.

Ejemplo 5: Resultados procedentes de hurones expuestos a la gripe que recibieron nuestras vacunas iniciales de ADN del virus de la gripe H1N1 en hurones:

Los hurones eran negativos para anticuerpos específicos de la gripe, siete días antes del inicio de las inmunizaciones, tal y como se midió con ELISA.

Anticuerpos séricos altamente específicos de IgG (para A/New Caledonia/20/99(H1N1) en ELISA) se observaron el día siete después de la exposición en hurones vacunados con vacunas de ADN de HA+NA de 1918 (dos plásmidos) y HA+NA+NP+M de 1918 (cuatro plásmidos) (Figura 2), pero expuestos a un virus de 1947. Los hurones vacunados con ADN de HA+NA de A/New Caledonia/20/99(H1N1) inducían una valoración de anticuerpos séricos específicos menor, el día siete. Es posible que se hubiera podido observar una mayor respuesta de los anticuerpos en puntos de tiempo posteriores, si el experimento no hubiera terminado el día siete después de la exposición, por razones prácticas.

El quinto día después de la exposición, los hurones vacunados con plásmido vacío (control de vacuna negativo) mostraban una carga vírica elevada en el lavado nasal, medida como copias de ARN vírico en los lavados nasales, indicando que no había protección contra la exposición vírica. Sin embargo, los hurones vacunados con vacunas de ADN de HA+NA de 1918 y HA+NA, NP+M de 1918 estaban completamente protegidos frente a una infección con un virus A/Forth Mounth/1/47(H1N1) (Figura 2). Se observó una protección parcial en los hurones vacunados con plásmidos de ADN de HA+NA de A/New Caledonia/20/99(H1N1).

Los datos muestran claramente que las inmunizaciones con ADN basado en genes de la cepa pandémica H1N1 de 1918 inducen una respuesta fuerte de anticuerpos específicos y protegen a los hurones completamente contra una infección con una cepa H1N1 de 1947. Por lo tanto, una exposición a un virus de la gripe H1N1 sometido a deriva, desencadena un reconocimiento de los anticuerpos generado por una vacuna de ADN basada en un virus heterólogo. Los genes de 1918 inducían una protección completa frente a la cepa de 1947, mientras que los genes de 1999 eran ligeramente menos eficaces. No se observaron efectos negativos o positivos sobre la respuesta inmune humoral o la protección mediante la inclusión de los genes de NP y M de 1918 en la vacunación con ADN de HA+NA, ya que la protección de la infección ya era casi del 100%.

Ejemplo 6: Segundo experimento con vacunas de ADN del virus de la gripe H1N1 en hurones: exposición al virus A/New Caledonia/20/99(H1N1):

Se comparó una vacuna de proteína convencional de H1N1 dividida (dos inmunizaciones) frente a una vacuna de ADN con codones optimizados de HA y NA de H1N1 de 1918, frente a HA y NA de H1N1 de New Caledonia con codones optimizados, frente a M y NP con codones optimizados del virus H1N1 de 1918, frente a un vector de vacuna de ADN vacío, utilizando tres inmunizaciones. Los hurones se expusieron al virus A/New Caledonia/20/99(H1N1) por vía intranasal y el virus se cuantificó en los lavados nasales mediante un ensayo de RT/PCR en tiempo real como en el ejemplo 3.

Los anticuerpos de hurón se examinan en busca de anticuerpos ELISA y anticuerpos HI como se ha descrito en los ejemplos 4 y 4c.

Ejemplo 7: Experimentos con anticuerpos de ratón:

Vacunas de ADN de HA y NA con codones optimizados frente a sin codones optimizados de New Caledonia H1N1 (muestra la diferencia entre la optimización de codones y la no optimización) frente a HA y NA con codones optimizados de la cepa H1N1 de 1918, se inoculan en ratones. Las valoraciones de los anticuerpos y el cartografiado de los epítomos de anticuerpos inducidos se realizan mediante péptidos solapantes en ELISA y reacciones cruzadas medidas para otros virus de la gripe A.

Ejemplo 8: Experimentos de expresión de proteínas:

Vacunas de ADN de HA y NA con codones optimizados frente a sin codones optimizados de New Caledonia H1N1 (muestra la diferencia entre la optimización de codones y la no optimización) frente a HA y NA con codones optimizados de la cepa H1N1 de 1918 se expresan en líneas celulares de mamífero *in vitro* y se realiza una radioinmuno-precipitación convencional (RIPA) con anticuerpos policlonales de la gripe A para examinar la expresión mejorada de proteínas, obtenida mediante la optimización de codones.

Ejemplo 9: Experimentos de inducción de citocinas:

Vacunas de ADN de HA y NA con codones optimizados frente a sin codones optimizados de New Caledonia H1N1 (muestra la diferencia entre la optimización de codones y la no optimización) frente a HA y NA con codones optimizados de la cepa H1N1 de 1918 se añaden sobre monocitos de sangre periférica (PBMCs) de mamífero *in vitro* y se

realizan mediciones de la producción resultante de citocinas en el material sobrenadante celular, para examinar la inducción inmune innata (efecto adyuvante) obtenida mediante la optimización de codones y por HA y NA con codones optimizados de H1N1 1918, en comparación con HA y NA con codones optimizados de H1N1 de New Caledonia, para examinar la inducción especial de citocinas por los genes de 1918.

5 Ejemplo 10: Experimentos con vacunas de proteínas de HA y NA de 1918:

Las proteínas son producidas por los plásmidos de la vacuna de ADN y se utilizan como una vacuna de proteína en ratones o hurones, en comparación con una vacunación con ADN y con una vacuna tradicional de proteínas dividida, para medir la inducción inmune de proteínas de 1918 frente a la vacuna de ADN.

Ejemplo 11: Experimentos de administración de vacunas de ADN de ratón:

- 10 Vacunas de ADN de HA y/o NA con codones optimizados de la cepa H1N1 de 1918 se inoculan en ratones como plásmidos de expresión o como un segmento lineal de ADN que contiene los componentes necesarios para una expresión del gen de la vacuna, pero sin el resto del plásmido, para descartar cualquier efecto del resto del plásmido.

Ejemplo 12: Experimentos de administración de vacunas de ADN de cerdo:

- 15 Vacunas de ADN de HA y/o NA con codones optimizados de la cepa H1N1 de 1918 se inoculan en cerdos como plásmidos de expresión o productos de PCR (del Ejemplo 14) y se exponen a una cepa de H1N1 similar a New Caledonia actual y se mide la protección frente a una enfermedad y la inducción inmune. Por tanto, las vacunas de ADN de H1N1, H2N2 y/o H3N2 se pueden aplicar en los cerdos que son susceptibles a virus patógenos de la gripe humana A.

- 20 Ejemplo 13: Resultados del segundo experimento con vacunas de ADN de H1N1 en hurones en comparación con la vacuna convencional.

En el segundo experimento (Ejemplo 6) se evaluó la eficacia de la protección inducida con la vacuna de ADN de 1918 frente un virus sometido a deriva durante cerca de 90 años, A/New Caledonia/20/99(H1N1). La protección se comparó de nuevo con la protección inducida por la vacuna de proteína trivalente convencional 2006-2007 en la que A/New Caledonia/20/99 era uno de los tres componentes de la vacuna. La capacidad de las diferentes vacunas para evitar una infección o el aclaramiento de la infección vírica, se midió mediante valoraciones del virus de la gripe A en lavados nasales, diez días después de la exposición.

Niveles de valoración de virus bajos se midieron para todos los grupos vacunados; sin embargo, todos los grupos vacunados con ADN tenían una reducción de la valoración de virus a lo largo de la infección, y el grupo vacunado con ADN de HA+NA de 1918 tenía una reducción significativa ($P < 0,05$) en la valoración de virus desde el cuarto día hasta el quinto día después de la exposición a A/New Caledonia/20/99 (Figura 8). La vacuna de ADN de HA+NA de A/New Caledonia/20/99 (H/N NC) era la vacuna más eficaz en la prevención de una infección y el aclaramiento del virus A/New Caledonia/20/99(H1N1). La vacuna de ADN de 1918 con las proteínas internas M y NP solas, parecía más eficaz que la vacuna de ADN de HA+NA de 1918 para proporcionar una protección cruzada frente a la exposición a un virus sometido a una deriva extrema. Curiosamente, no se observó ningún cambio significativo en la valoración de virus desde el tercer día hasta el sexto día para el grupo vacunado con la vacuna de proteína convencional o el plásmido vacío (Figura 8). El grupo de control negativo vacunado con un plásmido vacío tenía infección vírica todavía el séptimo día (por debajo del valor de corte de 10 TCID₅₀/ml) y un animal en el grupo de la vacuna convencional aún poseía una valoración de virus elevada el día 7. El día diez no se pudo detectar ningún virus en ningún grupo (no se muestra).

El tercer experimento que comparaba hurones vacunados con ADN de HA+NA de 1918, con hurones no vacunados, no sometidos previamente a experimentación, mostraba niveles elevados similares de valoración de virus para ambos grupos hasta el día 6. Sin embargo, el día 7 después de la infección, los hurones vacunados con ADN de HA+NA de 1918 tenían una reducción más eficaz de la valoración de virus ($P = 0,13$), en comparación con los hurones no sometidos previamente a experimentación ($P = 0,18$) y una carga vírica inferior el día 7, en comparación con el grupo no sometido previamente a experimentación ($P = 0,61$). Solo tres de cinco hurones en el grupo vacunado con ADN de 1918, tenían una carga vírica detectable el día siete, en comparación con cinco de cinco animales en el grupo no sometido previamente a experimentación (Figura 3c). Los hurones vacunados con ADN también mostraron menor elevación de la temperatura corporal que los hurones no vacunados (Figura 3a) y también tuvieron menos puntuación de los síntomas clínicos, en comparación con los hurones no sometidos previamente a experimentación (Figura 3c). No hubo diferencias en la pérdida de peso (Figura 3b).

Respuesta de anticuerpos específicos de la gripe después de una vacunación con ADN

Se observó una mayor valoración significativa de IgG contra la gripe A (ejemplo 4) en comparación con el grupo de control negativo, el día de la exposición, para los hurones vacunados con ADN de H/N de 1918, lo que indicaba una inducción de los anticuerpos específicos de la gripe después de la vacunación con ADN (Figura 10). El quinto día después de la infección, los animales vacunados con ADN de H/N de 1918 y H/N de 1999 y los animales vacunados

con vacunas convencionales, mostraron anticuerpos inducidos, específicos de la gripe (Figura 10). Los animales vacunados con ADN de H/N de 1918 tenían una valoración de anticuerpos de recordatorio comparable a la de los animales vacunados con vacunas convencionales, el séptimo día después de la infección (Figura 10). No se esperaba que los anticuerpos específicos de la gripe para el grupo vacunado con ADN de NP/M de 1918 se midieran en este ensayo ELISA previo a la exposición, debido a la utilización de una vacuna contra la gripe convencional como antígeno.

Inducción de anticuerpos neutralizantes después de la vacunación con ADN

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación (ejemplo 4b) se correlaciona con un ensayo de neutralización de virus y mide de qué modo los sueros de animales vacunados inactivan la unión de los virus de la gripe a los glóbulos rojos. Solo los hurones vacunados con la vacuna de ADN de H/N de H1N1 de 1999 tenían una valoración de HI significativa frente al virus A/New Caledonia/20/99(H1N1), después de una vacunación con ADN el día de la exposición (Fig. 9). Ni H/N de 1918 ni NP/M de 1918 se esperaba que proporcionaran valoraciones antes de la infección, debido a la larga deriva y a la acumulación de mutaciones en el sitio de unión al receptor de HA entre los virus H1N1 de 1918 y 1999. Los anticuerpos contra NP o M no son neutralizantes. La vacuna de ADN de H/N de 1999 proporcionó una mejor respuesta recordatoria de los anticuerpos neutralizantes que la vacuna de proteína trivalente convencional (Figura 9). El día cinco después de la infección, 60% de los hurones vacunados con ADN de H/N de H1N1 de 1999 se habían seroconvertido (HI>40), en comparación con el 40% de los hurones en el grupo de la vacuna convencional. También un aumento >2,5 en HI MGT se llevó a cabo después de la vacunación, medido el día de la exposición (Figura 9).

Ejemplo 14: Resultados de la vacuna de ADN de H3N2 pandémico en hurones

Para demostrar el principio de reactividad cruzada amplia, obtenida mediante el uso particular de las proteínas de la superficie pandémicas como vacunas de ADN, se evaluó la protección frente a una exposición al virus contemporáneo H3N2 después de una vacunación con HA y NA con los codones optimizados de la gripe H3N2 pandémica de 1968 de Hong Kong, como vacuna de ADN en hurones. Los hurones fueron vacunados (Ejemplo 2) con pistola de genes (PMED) tres veces, con dos semanas de diferencia, con la vacuna de ADN de HA + NA basada en el virus de 1968 o de 2007/08 (A/Wisconsin/67/05(H3N2)). Los grupos de control se vacunaron dos veces, con tres semanas de diferencia, con la vacuna de proteína trivalente convencional. El grupo de control negativo no recibió ninguna vacunación antes de la exposición. Todos los hurones fueron expuestos dos semanas después de la última vacunación.

Las fosas nasales de los hurones se lavaron después de la exposición con 1 ml de PBS y los lavados se almacenaron inmediatamente a -80°C. La valoración del virus se midió mediante RT-PCR en tiempo real (Ejemplo 3) en el gen de la proteína matriz de la gripe A y se correlacionó con una curva patrón de TCID₅₀/ml conocida del virus H3N2 2007/08 en células MDCK. Los grupos vacunados con ADN tenían una reducción de la valoración del virus durante la incubación vírica, que no se observó en los grupos de control. Solo los hurones vacunados de forma convencional y los hurones no vacunados tenían una valoración de virus presente el día 12 después de la infección (Figura 5).

Se recogió la sangre de los hurones en diferentes puntos de tiempo después de la exposición y se analizaron los sueros en busca de anticuerpos IgG específicos del virus de la gripe H3N2 de 2007/08 mediante ELISA (Ejemplo 4). Las vacunas de ADN inducían IgG específicas del virus de la gripe de 2007/08 en el suero, después de una vacunación al igual que la vacuna convencional (Figura 6). Los hurones vacunados con ADN de 1968 generaron anticuerpos con una reacción cruzada elevada frente a la exposición al virus contemporáneo A/Wisconsin/67/05(H3N2). La respuesta dirigida contra el virus expuesto no se pudo observar antes del día 7 en el grupo no sometido previamente a experimentación. El nivel de anticuerpos específicos de la gripe en el grupo vacunado con ADN de HA+NA de 2007/08 es comparable con el nivel observado en el grupo de la vacuna convencional.

Los sueros sanguíneos recogidos en diferentes puntos de tiempo después de la exposición, se midieron en busca de anticuerpos inhibidores de la aglutinación (HI) del virus H3N2 A/Aichi/2/68 y A/Wisconsin/67/05 mediante un ensayo de HI (Ejemplo 4b). Se midieron las valoraciones ya que la última dilución de sueros proporcionaba una inhibición del 100% de 4 unidades de hemaglutinación (HAU) de virus en 25 µ (Figura 7). A) Se observaron valoraciones elevadas de HI en sueros frente al virus de 1968 después de una vacunación con ADN de HA+NA de 1968. Los anticuerpos generados después de una vacuna de ADN de HA+NA de 2007/08 o convencional, no tenían una reacción cruzada con el virus de 1968. B) Se observaron valoraciones elevadas de HI con reacción cruzada frente al virus de 2007/08 en agrupaciones después de una vacunación con ADN de 1968. Los hurones vacunados con ADN de 2007/08 tenían más anticuerpos HI contra el virus de 2007/08 después de la vacunación, que los hurones inmunizados con la vacuna trivalente convencional de proteína de 2007/08.

La vacunación con HA de H3N2 de 1968 inducía protección frente a una cepa de virus H3N2 de 1968 y una sometida a deriva más actual (2007).

Ejemplo 15: Vacuna de ADN de virus pandémico H1N1v en cerdos

Los cerdos y hurones se vacunaron con la mezcla de vacuna de ADN que contenía plásmidos que codificaban HA y NA procedentes de H1N1v, con o sin plásmidos de ADN que codificaban M y NP procedentes de H1N1 de 1918, con o sin plásmidos de ADN que codificaban HA y NA de una cepa de H3N2 estacional (A/Wisconsin/67/05), usando los

genes sintetizados con codones humanos preferidos para una expresión elevada en seres humanos, hurones y cerdos. Se evaluaron los niveles de valoración de inhibición de hemaglutinina (HI) y/o valoración de anticuerpos neutralizantes y/o anticuerpos IgG totales y/o protección frente a una exposición con virus heterólogo u homólogo, según se midió por aclaramiento vírico más rápido en las vías respiratorias después de una o dos inmunizaciones con ADN (ejemplo 3, 4 y 4b).

Para determinar la inmunidad protectora cruzada en cerdos después de la vacunación con la vacuna de ADN del virus de la gripe, basada en los genes de HA y NA del nuevo virus pandémico H1N1v de 2009, con o sin los genes de NP y M del virus pandémico H1N1 de 1918, administrados con pistola de genes o por electroporación, vacunamos dos veces cuatro cerdos con 6 semanas de edad, con tres semanas de diferencia, y los expusimos 10 semanas después de la última inmunización, a 1×10^7 EID₅₀ de un virus H1N1 estacional porcino (A/cerdo/Dinamarca/19126/93). Se incluyeron cuatro cerdos como animales sin una experimentación previa, que no recibieron la vacuna.

Un cerdo vacunado con pistola de genes recibió perlas tanto de HA y NA de H1N1v como de NP y M de H1N1 de 1918. El otro animal en el grupo de pistola de genes recibió una dosis doble de perlas de HA y NA de H1N1v. Un cerdo vacunado mediante electroporación recibió inyecciones de ADN tanto de HA y NA de H1N1v de 2009 como de NP y M de H1N1 de 1918, mientras que el otro cerdo en el grupo de electroporación recibió inyecciones dobles de ADN de HA y NA de H1N1v de 2009.

Los cerdos se vacunaron de la siguiente manera:

Tres grupos:

Gr1	Pistola de genes
Gr2	Electroporación
Gr3	sin vacuna previa

20

Detalles de la vacunación del grupo 1 y 2:

Grupo 1 de pistola de genes	
Cerdo 1	<p>Perlas de HA+NA de H1N1v Cara dorsal de cada oreja: dos disparos Cara interna de cada muslo: dos disparos</p> <p>NP+M de 1918 Cara dorsal de cada oreja: dos disparos Cara interna de cada muslo: dos disparos</p>
Cerdo 2	<p>Perlas de HA+NA de H1N1v Cara dorsal de cada oreja: cuatro disparos Cara interna de cada muslo: cuatro disparos</p>
Grupo 2 de electroporación	
Cerdo 3	<p>HA de H1N1v Cara dorsal de cada oreja: una inyección de 50 µl, un pulso Cara interna de cada muslo: una inyección de 50 µl, un pulso</p> <p>NA de H1N1v Cara dorsal de cada oreja: una inyección de 50 µl, un pulso Cara interna de cada muslo: una inyección de 50 µl, un pulso</p> <p>NP de 1918 Cara dorsal de cada oreja: una inyección de 50 µl, un pulso Cara interna de cada muslo: una inyección de 50 µl, un pulso</p> <p>M de 1918 Cara dorsal de cada oreja: una inyección de 50 µl, un pulso Cara interna de cada muslo: una inyección de 50 µl, un pulso</p>

Cerdo 4	HA de H1N1v Cara dorsal de cada oreja: dos inyecciones de 50 µl, un pulso Cara interna de cada muslo: dos inyecciones de 50 µl, un pulso NA de H1N1v Cara dorsal de cada oreja: dos inyecciones de 50 µl, un pulso Cara interna de cada muslo: dos inyecciones de 50 µl, un pulso
----------------	--

Inmunizaciones:

Vacunación con pistola de genes:

- 5 Presión de helio: -29 bar (-420 psi)
 Un disparo ~ 2 µg de ADN
 El cerdo 1 recibe un total de 16 disparos
 El cerdo 2 recibe un total de 16 disparos
- 1ª vacunación día 0
 2ª vacunación día 21

10 **Electroporación**

Ajustes:

- 0,2 A, un pulso (varios pulsos en una pulsación), 52 ms/pulso, una inyección contiene 50 µl de 2 µg/µl de ADN (100 µg de ADN en una inyección).
- 15 El cerdo 3 recibe 16 inyecciones y 16 pulsos
 El cerdo 4 recibe 16 inyecciones y 16 pulsos
- 1ª vacunación día 0
 2ª vacunación día 21

Todos los grupos se expusieron 10 semanas después de la última inmunización a 1×10^7 TCID₅₀ de virus estacional A/cerdo/Dinamarca/19126/93(H1N1).

- 20 Muestras: La sangre y los frotis nasofaríngeos se recogieron de forma secuencial después de la exposición y los animales fueron sacrificados 14 días después de la exposición

Resultados

Valoración de virus en muestras nasofaríngeas:

- 25 Todos los cerdos vacunados con ADN eran capaces de aclarar la exposición al virus heterólogo de manera más eficaz que los cerdos no sometidos a un tratamiento previo que no recibieron la vacuna (Figura 11). La única vacuna capaz de evitar la infección era el ADN de HA y NA de H1N1v administrado mediante electroporación.

Inhibición de la hemaglutinación con reacción cruzada del virus pandémico H1N1v

- 30 La vacuna de ADN de HA y NA de H1N1v administrada mediante electroporación era capaz de inducir una valoración de HI frente a H1N1v superior a 40, 10 días después de la segunda vacunación (figura 12). El cerdo era capaz de conservar la valoración 10 semanas después de la segunda vacunación. Todos los cerdos vacunados con ADN mostraron anticuerpos HI con reacción cruzada significativa frente al virus H1N1v, desde cinco días después de la exposición al virus heterólogo estacional porcino H1N1 de 1993. Estos resultados indican que la exposición a una cepa diferente a la que comprende la vacuna de ADN, es capaz de desencadenar algunos anticuerpos HI comunes después de la vacunación con ADN, induciendo anticuerpos HI con reacción cruzada neutralizantes eficaces.

35 Fiebre

Los cuatro cerdos inmunizados con la vacuna de ADN de H1N1v pandémico no mostraron un aumento de la temperatura corporal durante la infección con el virus porcino estacional de 1993; sin embargo, los cerdos no vacunados tuvieron fiebre el día 1 después de la exposición (Figura 13).

- 40 Ejemplo 16: Uso de productos de la PCR transcripcionalmente activos procedentes de la gripe A como vacunas de ADN en lugar de ADN plasmídico:

Los productos de la PCR se pueden obtener usando los genes de vacunas con codones optimizados procedentes de productos de la PCR transcripcionalmente activos de una cepa de la gripe A pandémica como molde y los mis-

mos productos de la PCR se pueden utilizar como una vacuna de ADN. Para que los productos de la PCR sean transcripcionalmente funcionales contendrán todos los componentes necesarios para la señalización (promotor, Kozak y terminador) para una transcripción eficaz de un gen deseado de la gripe o de un gen parcial en el hospedador. De esta forma no sería necesaria una estructura principal de plásmido, por ejemplo, con un marcador de resistencia a antibióticos y ADN.

Ejemplo 17: Vacuna de ADN que codifica proteínas de la gripe exentas de glicosilación:

Los genes de la gripe se mutan de forma dirigida al sitio en una estructura principal de plásmido para eliminar las glicosilaciones ligadas a N deseadas en sitios antigénicos en el gen de HA y NA. Las glicosilaciones deseadas que deben ser eliminadas son todas o algunas de las que se han añadido a las cepas pandémicas durante la evolución y la deriva, conduciendo hasta las cepas actuales circulantes de la gripe A de tipo H1N1, H2N2, H3N2, respectivamente. Proteínas completamente despojadas de glicosilaciones también se pueden producir de esta manera.

Ejemplo 18: Composición de una vacuna de ADN universal contra la gripe:

Una vacuna de ADN se forma de modo que contiene genes con codones optimizados del virus de la gripe H1N1, H3N2 y la gripe B: para H1N1 y H3N2 debe haber HA y NA procedentes de una cepa pandémica original y una cepa contemporánea, por ejemplo, New Caledonia/20/99(H1N1) y/o Wisconsin/67/05(H3N2), posiblemente mutadas para expresar menos proteína glicosilada. Además, para obtener una reactividad cruzada más amplia, los genes de M y NP de H1N1 pandémico tienen que estar incluidos. Esto dará como resultado una vacuna trivalente que inducirá una protección a largo plazo contra todos los subtipos de H3 y H1, incluyendo la mayoría de las cepas de la gripe B. La vacuna de ADN universal bien podría ser una agrupación de los once plásmidos o una mezcla de vectores bicistrónicos. Alternativamente, los componentes de la vacuna pandémica se podrían proporcionar como una vacuna de ADN como refuerzo y la vacuna de proteína trivalente convencional en el mercado podría servir como inductor. El objetivo es una vacuna que actúe durante toda la vida, por lo menos las vacunas estacionales serían innecesarias.

Ejemplo 19: Vacuna de ADN universal contra el virus de la gripe H1N1 y H3N2

Hemos demostrado anteriormente que las diferentes vacunas de ADN contra la gripe basadas en una combinación de subtipos de virus de la gripe, por ejemplo H1N1 o H1N1v o H3N2, son eficaces en la inducción de protección contra el subtipo de virus dado.

Sin embargo, la vacuna óptima contra la gripe comprendería componentes tanto de H1N1 como de H3N2. Por lo tanto, diseñamos una "vacuna de ADN universal contra la gripe" que se basa en la HA y NA del reciente virus H1N1v pandémico, los genes internos de NP y M del virus H1N1 pandémico anterior de 1918, y los genes de HA y NA de un virus H3N2 estacional. Este ejemplo se centra en la "vacuna de ADN universal contra la gripe" administrada junto con un plásmido auxiliar que actúa como adyuvante. Si se administra por vía intranasal, el ADN antigripal junto con el plásmido auxiliar estarán incluidos en una formulación lipídica para una administración óptima en la mucosidad. La respuesta inmune inducida por la vacuna de ADN universal contra la gripe, ya sea administrada por vía intranasal o por medio de una pistola de genes o mediante electroporación, será evaluada en un modelo animal. Se investigará la protección y la protección cruzada frente a una exposición a un virus homólogo y heterólogo.

Referencias:

1. Antonovics, J., M. E. Hood y C. H. Baker. 2006. Molecular virology: Was the 1918 flu avian in origin? *Nature* 440:E9.
2. Bragstad, K., P. H. Jorgensen, K. J. Handberg, S. Møllergaard, S. Corbet y A. Fomsgaard. 2005. New avian influenza A virus subtype combination H5N7 identified in Danish mallard ducks. *Virus. Res.* 109:181-190.
- 2a Bragstad, K., Martel, CM., Jensen KL., Thomsen JS., Nielsen LP., Aasted B. y Fomsgaard A., Pandemic influenza 1918 H1N1 and 1968 H3N2 DNA vaccines induce protective immunity against infection with decades of drifted viruses, entregado 2009.
3. Caton, A. J., G. G. Brownlee, J. W. Yewdell y W. Gerhard. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 haemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31:417-427.
4. Chen, Z., S. e. Kadowaki, Y. Hagiwara, T. Yoshikawa, K. Matsuo, T. Kurata y S. i. Tamura. 2000. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine* 18:3214-3222.
5. Corbet, S., L. Vinner, D. M. Hougard, K. Bryder, H. V. Nielsen, C. Nielsen y A. Fomsgaard. 2000. Construction, biological activity, and immunogenicity of synthetic envelope DNA vaccines based on a primary, CCR5-tropic, early HIV type 1 isolate (BX08) with human codons. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:1997-2008.
6. Davis, H. L., B. A. Demeneix, B. Quantin, J. Coulombe y R. G. Whalen. 1993. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.* 4:733-740.
7. Donnelly, J. J., A. Friedman, D. Martinez, D. L. Montgomery, J. W. Shiver, S. L. Motzel, J. B. Ulmer y M. A.

- Liu. 1995. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat. Med* 1:583-587.
- 5 8. Epstein, S. L., W. p. Kong, J. A. Misplon, C. Y. Lo, T. M. Tumpey, L. Xu y G. J. Nabel. 2005. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 23:5404-5410.
- 8a. Finter NB. 1964 Quantitative haemadsorption, a new assay technique. I. Assay of interferon. *Virology*; 24:589-97.
9. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41:95-98.
- 10 10. Johnson, N. P. and J. Mueller. 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull. Hist Med* 76:105-115.
11. Kawaoka, Y., S. Krauss y R. G. Webster. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63:4603-4608.
- 15 12. Kobasa, D., A. Takada, K. Shinya, M. Hatta, P. Halfmann, S. Theriault, H. Suzuki, H. Nishimura, K. Mitamura, N. Sugaya, T. Usui, T. Murata, Y. Maeda, S. Watanabe, M. Suresh, T. Suzuki, Y. Suzuki, H. Feldmann y Y. Kawaoka. 2004. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431:703-707.
- 20 13. Kodihalli, S., H. Goto, D. L. Kobasa, S. Krauss, Y. Kawaoka y R. G. Webster. 1999. DNA vaccine encoding haemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J. Virol.* 73:2094-2098.
14. Kodihalli, S., J. R. Haynes, H. L. Robinson y R. G. Webster. 1997. Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the haemagglutinin. *J. Virol.* 71:3391-3396.
15. Kodihalli, S., D. L. Kobasa y R. G. Webster. 2000. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine* 18:2592-2599.
- 25 16. Kong, W. p., C. Hood, Z. y. Yang, C. J. Wei, L. Xu, A. Garcia-Sastre, T. M. Tumpey y G. J. Nabel. 2006. Protective immunity to lethal challenge of the 1918 pandemic influenza virus by vaccination. *PNAS* 103:15987-15991.
17. Lindstrom, S. E., N. J. Cox y A. Klimov. 2004. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology* 328:101-119.
- 30 18. Ljungberg, K., C. Kolmskog, B. Wahren, G. van Amerongen, M. Baars, A. Osterhaus, A. Linde y G. Rimmelzwaan. 2002. DNA vaccination of ferrets with chimeric influenza A virus haemagglutinin (H3) genes. *Vaccine* 20:2045-2052.
- 18a. Ljungberg K, Rollman E, Eriksson L, Hinkula J, Wahren B. Enhanced immune responses after DNA vaccination with combined envelope genes from different HIV-1 subtypes. *Virology* 2002; 302(1):44-57.
- 35 18b. Martel CJ, Aasted B. Characterization of antibodies against ferret immunoglobulins, cytokines and CD markers. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 2009;
- 18C. Olsen CH. Review of the use of statistics in infection and immunity. *Infect Immun.* 2003; 71(12):6689-92.
19. Reid, A. H., T. G. Fanning, J. V. Hultin y J. K. Taubenberger. 1999. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus haemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:1651-1656.
- 40 20. Reid, A. H., T. G. Fanning, T. A. Janczewski y J. K. Taubenberger. 2000. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 97:6785-6790.
- 20a. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal.Biochem.* 2000; 285(2):194-204.
- 45 21. Seo, S. H., E. Hoffmann y R. G. Webster. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 8:950-954.
22. Smith, H. and C. Sweet. 1988. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev. Infect Dis* 10:56-75.
23. Spackman, E., D. A. Senne, T. J. Myers, L. L. Bulaga, L. P. Garber, M. L. Perdue, K. Lohman, L. T. Daum y

- D. L. Suarez. 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutinin subtypes. *J Clin. Microbiol.* 40:3256-3260.
24. Talon, J., C. M. Horvath, R. Polley, C. F. Basler, T. Muster, P. Palese y A. Garcia-Sastre. 2000. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 74:7989-7996.
- 5 25. Tamura, S., T. Tanimoto y T. Kurata. 2005. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn. J Infect Dis* 58:195-207.
26. Taubenberger, J. K., A. H. Reid, R. M. Lourens, R. Wang, G. Jin y T. G. Fanning. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437:889-893.
- 10 27. Tumpey, T. M., C. F. Basler, P. V. Aguilar, H. Zeng, A. Solorzano, D. E. Swayne, N. J. Cox, J. M. Katz, J. K. Taubenberger, P. Palese y A. Garcia-Sastre. 2005. Characterization of the reconstructed 1918 spanish influenza pandemic virus. *Science* 310:77-80.
- 15 28a Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, J. K. Taubenberger, P. Palese, D. E. Swayne, M. J. Pantin-Jackwood, S. Schultz-Cherry, A. Solorzano, N. Van Rooijen, J. M. Katz y C. F. Basler. 2005b. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol* 79:14933-14944
28. Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, J. K. Taubenberger, P. Palese, D. E. Swayne y C. F. Basler. 2004. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 101:3166-3171.
- 20 29. Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, J. K. Taubenberger, P. Palese, D. E. Swayne, M. J. Pantin-Jackwood, S. Schultz-Cherry, A. Solorzano, N. Van Rooijen, J. M. Katz y C. F. Basler. 2005. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol* 79:14933-14944.
- 25 30. Ulmer, J. B., T. M. Fu, R. R. Deck, A. Friedman, L. Guan, C. DeWitt, X. Liu, S. Wang, M. A. Liu, J. J. Donnelly y M. J. Caulfield. 1998. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol* 72:5648-5653.
31. Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg y A. Garcia-Sastre. 2000. Influenza A Virus NS1 Protein Prevents Activation of NF-kappa B and Induction of Alpha/Beta Interferon. *J. Virol.* 74:11566-11573.
32. Webster, R. G., E. F. Fynan, J. C. Santoro y H. Robinson. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 12:1495-1498.
- 30 33. WHO. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2009;
34. Vinner L, Therrien D, Wee E, et al. Immune response in rhesus macaques after mixed modality immunisations with DNA, recombinant adenovirus and recombinant gp120 from human immunodeficiency virus type 1. *APMIS* 2006; 114(10):690-9.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Statens Serum Institut
- <120> Vacunas contra la gripe optimizadas
- <130> 15032pc
- <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.1
- 40 <210> 1
- < 211> 1701
- < 212> ADN
- < 213> Virus de la gripe A

ES 2 614 802 T3

<400> 1
atggaggcca ggctgctggt gctgctgtgc gccttcgccc ccaccaacgc cgacaccatc 60
tgcacggctt accacgcca caacagcacc gacaccgtgg atacctgtct ggagaagaac 120
gtgaccgtga cccacagcgt gaacctgctg gaggacagcc acaacggcaa gctgtgcaag 180
ctgaaggga tcgctccct gcagctgggc aagtgaaca tcgccggctg gctgctgggc 240
aaccctgagt gcgacctgt gctgaccgcc agcagctggt cctacatcgt ggagaccagc 300
aacagcgaga acggcacctg ctacccggc gacttcacg actacgagga gctgcgggag 360
cagctgtcca gcgtgagcag ctccgagaag ttcgagatct tcccaagac cagctcctgg 420
cccaaccag agaccacaa gggcgtgacc gccgcctgta gctacgccg agccagcagc 480
ttctacagaa acctgtgtg gctgaccaag aagggcagca gctacccaa gctgtccaag 540
agctacgtga acaacaagg caaggaagt ctgggtctgt gggcgctgca ccacccct 600
accggcaccg accagcagag cctgtaccag aacgccgacg cctacgtgag cgtgggcagc 660
agcaagtaca acagaaggt caccctcag atcgcccca ggccaaggt gcgagaccag 720
gccggcagga tgaactacta ctggaccctg ctggagccc gcgacaccat caccttcgag 780
gccaccgca acctgatcg ccttggtac gccttcgcc tgaacagggg cagcggcagc 840
ggcatcatca ccagcagc cccctgac gactgaaca ccaagtcca gacccccac 900
ggagcatca acagcagct gccctccag aacatccacc ccgtgacct cggcgagtgc 960
cccaagtacg tgagaagc caagctgagg atggccaccg gctgaggaa catccccagc 1020
atccagagca ggggctgtt cggagccatc gccggaltca tcgagggcgg ctggaccggc 1080
atgatcgagc gctggtacgg ctaccaccac cagaacgagc agggcagcgg ctacgccgcc 1140
gaccagaaga gcaccagaa cgccatcgac ggcacacca acaagtgaa cagcgtgatc 1200
gagaagatga acaccagtt caccgccgtg ggcaaggagt tcaacaact ggagaggcgg 1260
atcgagaacc tgaacaagaa ggtggacgac ggcttctg acatctggac ctacaagcc 1320
gagctgctgg tgctgctgga gaacgagagg acctggact tccacgacag caactgagg 1380
aacctgtacg agaaggtgaa gagccagctg aagaacaacg ccaaggagat cggcaacggc 1440
tgcttcgagt tclaccacia gtgcgacgac gccctgatgg agagcgtgag aaacggcacc 1500
tacgactacc ccaaglacag cgaggagagc aagctgaacc gggaggagat cgacggcgtg 1560
aagctggaga gcatggcgt gtaccagatc ctggccatct acagaccgt ggccagcagc 1620
ctggctgctc tgggtccct gggagccatc agctttgga tgtcagcaa cggcagcctg 1680
cagtcagga tctgatctg a 1701

5

<210> 2
< 211> 566
< 212> PRT
< 213> Virus de la gripe A

ES 2 614 802 T3

<400> 2

Met Glu Ala Arg Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
1 5 10 15

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

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

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

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

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

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

ES 2 614 802 T3

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

Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn
210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Leu Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro
275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn
290 295 300

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

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

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

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

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

ES 2 614 802 T3

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

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

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

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

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

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

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

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

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
515 520 525

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

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

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 3

< 211> 1410

< 212> ADN

< 213> Virus de la gripe A

5

<400> 3

atgaaccca accagaagat catcaccatc ggcagcatct gcatgggtgg gggcatcatc 60

agcctgatcc tgcagatcgg caacatcatc agcatctggg tgtccacag catccagacc 120

ES 2 614 802 T3

ggcaaccaga accacccga gacctgcaac cagtccatca tcacctcga gaacaacacc 180
 tgggtgaacc agacctactg gaacatcagc aacaccaacg tgggtggccgg ccaggacgcc 240
 acctccgtga tctgacagc caacagcagc ctgtgcccc tcagcggctg ggccatctac 300
 agcaaggaca acggcatcag gatcggcagc aagggcgacg tgttcgtgat cagagagccc 360
 ttcacagct gcagccacct ggaatgcagg accttctcc tgaccaagg agccctgctg 420
 aacgacaagc acagcaacgg caccgtgaag gacagaagcc cctacaggac cctgatgagc 480
 tgccccgtgg gcgaggctcc cagcccctac aacagcagat tcgagagcgt ggcttggctc 540
 gccagcgct gccacgacgg catgggctgg ctgacctcg gcatcagcgg ccctgacaac 600
 ggggcccgtg ccgtgctgaa gtacaacgga atcatcaccg acaccatcaa gagctggcgg 660
 aacaacatcc tgaggacceca gaaagcgag tgcgctgcg tgaacggcag ctgcttcacc 720
 atcatgaccg acggccccag caacggccag gccagctaca agatcctgaa gatcgagaag 780
 ggcaaggatg ccaagagcat cgagctgaa gcccctaact accactacga ggaatgcagc 840
 tctacccc acaccggcaa ggtcatgtgc gtgtgcaggg acaactggca cggcagcaac 900
 aggccctggg tgtctctcga ccagaacctg gactaccaga tcggatacat ctgcagcggc 960
 gtgttcggcg acaaccccag gcccacgac ggcaccggca gctgcggccc tgtgagcagc 1020
 aacggggcca atggatcaa gggcttcagc tcagatacg acaacggcgt gtggatcggc 1080
 cgcaccaaga gcaccagcag cagatccggc tcgagatga tctgggaccc caacggctgg 1140
 accgagaccg acagcagctt cagcgtgagg caggacatcg tggccatcac cgactggctc 1200
 ggctacagcg gcagcttctg gcagcaccgc gagctgaccg gcctggactg catgaggccc 1260
 tgttctggg tggagctgat cagaggccag cccaaggaga acaccatctg gaccagcggc 1320
 agcagcatca gctttgcgg cgtgaacagc gacaccgtgg gctggtcctg gcccagcggg 1380
 gccgagctgc ccttcagcat cgataagtga 1410

<210> 4
 < 211> 469
 < 212> PRT
 < 213> Virus de la gripe A

5

<400> 4
 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Val
 1 5 10 15
 Val Gly Ile Ile Ser Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile

ES 2 614 802 T3

20 25 30
 Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln Asn His Pro Glu Thr
 35 40 45
 Cys Asn Gln Ser Ile Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln
 50 55 60
 Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Val Val Ala Gly Gln Asp Ala
 65 70 75 80
 Thr Ser Val Ile Leu Thr Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly
 85 90 95
 Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly
 100 105 110
 Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu
 115 120 125
 Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His
 130 135 140
 Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser
 145 150 155 160
 Cys Pro Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser
 165 170 175
 Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Met Gly Trp Leu Thr
 180 185 190
 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr
 195 200 205
 Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu
 210 215 220
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr
 225 230 235 240
 Ile Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Leu
 245 250 255
 Lys Ile Glu Lys Gly Lys Val Thr Lys Ser Ile Glu Leu Asn Ala Pro
 260 265 270

ES 2 614 802 T3

Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Thr Gly Lys Val
275 280 285

Met Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val
290 295 300

Ser Phe Asp Gln Asn Leu Asp Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly
305 310 315 320

Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly
325 330 335

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

Tyr Asp Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Ser Ser Arg
355 360 365

Ser Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp
370 375 380

Ser Ser Phe Ser Val Arg Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser
385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp
405 410 415

Cys Met Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Gln Pro Lys
420 425 430

Glu Asn Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val
435 440 445

Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro
450 455 460

Phe Ser Ile Asp Lys
465

<210> 5

< 211> 1497

< 212> ADN

< 213> Virus de la grippe A

ES 2 614 802 T3

<400> 5
atggccagcc agggcaccaa gagaagctac gagcagatgg aaaccgacgg cgagaggcag 60
aacgccaccg agatcagggc cagcgtgggc aggatgatcg gcggcatcgg caggttctac 120
atccagatgt gcaccgagct gaagctgtcc gactacgagg gcaggctgat ccagaacagc 180
atcaccatcg agaggatggt gctgtccgcc ttcgacgaga gaagaaacaa gtacctggaa 240
gagcacccca gcgcccggca ggaccccaag aaaaccggcg gacctatca cagaaggatc 300
gacggcaagt ggatgagaga gctgatcctg tacgacaagg aggaaatcag aaggatctgg 360
cggcaggcca acaacggcga ggacgccaca gccggcctga cccatgat gatctggcac 420
agcaacctga acgacgccac ctaccagagg accagggccc tcgtcagaac cggcatggac 480
ccccggatgt gcagcctgat gcagggcagc aactgccca gaagaagcgg agctgctgga 540
gccgccgtga agggcgtggg caccatggtg atggaactga tcaggatgat caagaggggc 600
atcaacgaca ggaactttg gaggggagc aacggcagaa ggaccaggat gcctctacgag 660
aggatgtgca acatcctgaa gggcaagtc cagacagccg cccagagggc catgatggac 720
caggtccggg agagcaggaa ccccggcaac gccgagatcg aggacctgat ctctctggcc 780
agaagcggcc tgatcctgag gggcagcgtg gcccaacaaga gctgctctcc cgctgctg 840
tacggaccgg ccgtggccag cggctacgac ttcgagagag agggctacag cctggtcggc 900
atgacccct tcaggctgct gcagaactcc caggtglact ctctgatcag gcccaacgag 960
aaccggccc acaagtccca gctggtctgg atggcctgcc acagcggcg ctctcaggat 1020
ctgagagtga gcagcttcat caggggcacc agagtgggtc ccaggggcaa gctgtccacc 1080
aggggctgct agatgccag caacgagaac atggaacca tggacagcag caccctggaa 1140
ctgagaagca ggtactggc catcaggacc agaagcggcg gcaacaccaa ccagcagagg 1200
gccagcggc gacagatcag cgtgcagccc accttctccg tcagaggaa cctgcccttc 1260
gagagggcca ccatcatggc gccttcacc ggcaacaccg agggcaggac cagcgacatg 1320
aggaccgaga tcatacgaat gatgaaagc gccagggccc aggacgtgag ctccagggc 1380
aggggctgt tcagctgtc cgatgagaag gccacctccc ccatcgtgcc cagcttcgac 1440
atgagcaacg agggcagcta ctctctggc gacaacggcg aggaatcga caactga 1497

<210> 6
< 211> 498
< 212> PRT
< 213> Virus de la gripe A

5

ES 2 614 802 T3

<400> 6

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Ile Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

~~Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu~~
 245 250 255

ES 2 614 802 T3

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly
275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu
305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr Arg Val
340 345 350

Val Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Met Asp Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg
370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg
385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
485 490 495

Asp Asn

<210> 7

< 211> 988

< 212> ADN

< 213> Virus de la gripe A

ES 2 614 802 T3

<400> 7
atgagtcttt taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tegtcccgtc aggcccccctc 60
aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120
gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta 180
ggatttgtgt tcacgctcac cgtgccccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
caaaatgcc ttaatgggaa cggggatcca aataacatgg acagagcagt taaactgtac 300
aggaagctta agagggagat aacattccat ggggccaaag aagtagcact cagtattcc 360
gctgggtcac ttgccagttg tatgggcctc atatacaaca ggatggggac tgtgaccact 420
gaagtggcat ttggcctggt atgcgcaacc tgtgaacaga ttgctgattc ccagcatcgg 480
tctcacaggc aaatggtgac aacaaccaat ccactaatca gacatgagaa cagaatggta 540
ctggccagca ctacggctaa ggctatggag caaatggctg gatcgagtga gcaagcagca 600
gaggccatgg aggttgctag tcaggctagg caaatggctc aggcgatgag aaccattggg 660
actcatccta gctccagtgc tggctgaaa gacgatctta ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaaaacgaa tgggggtgca gatgcaacga ttcaagtgat cctctcgta ttgccgcaag 780
tatcattggg atcttgact tgatattgtg gattcttgat cgtcttttt tcaaatgcat 840
ttatcgtcgc cttaaatacg gtttgaanaag agggccttct acggaaggag tgccggagtc 900
tatgagggaa gaataatcga aggaacagca gagtgtgtg gatgttgacg atggtcattt 960
tgtcaacata gagctggagt aaggcgcc 988

<210> 8
< 211> 252
< 212> PRT
< 213> Virus de la gripe A

<400> 8
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
1 5 10 15

5

ES 2 614 802 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 97

<212> PRT

<213> Virus de la gripe A

5

ES 2 614 802 T3

<400> 9

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Pro Leu Val Ile Ala Ala Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe
35 40 45

Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Leu Lys Tyr Gly Leu Lys Arg Gly Pro Ser
50 55 60

Thr Glu Gly Val Pro Glu Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln
65 70 75 80

Gln Ser Ala Val Asp Val Asp Asp Gly His Phe Val Asn Ile Glu Leu
85 90 95

Glu

<210> 10

< 211> 1723

< 212> ADN

< 213> Virus de la gripe A

5

<400> 10

atgaaggcta tctggtggt gctgctgtac acctcgcca cgcacaacgc cgataccctg 60

tgcacggct accacgcaa caacagcacc gacaccgtgg ataccgtgct ggaaaagaac 120

gtgaccgtga cccacagcgt gaacctgctg gaagataagc acaacggcaa gctgtgcaag 180

ctgagaggcg tggcccctct gcacctgggc aagtgaata tcgccggctg gatcctgggc 240

aaccccgagt gcgagagcct gacacccgc agctcttggc cctacatcgt ggagacaccc 300

agcagegaca acggcacctg ttacccggc gacttcacg actacgagga actgcgggag 360

cagctgtcca gcgtgtccag ctgcagcgg ttcgagatct tcccaagac cagctcctgg 420

ES 2 614 802 T3

cccaaccacg acagcaacaa gggcgtgacc gccgcctgtc ctcacgtgg ggccaagagc 480
 ttctacaaga acctgatctg gctggtgaag aagggcaaca gctaccccaa gctgtccaag 540
 agctacatca acgacaagg caaagagggt ctggtgctgt ggggcatcca ccaccctagc 600
 accagcggc accagcagag cctgtaccag aacgccgaca cctacgtgtt cgtgggcagc 660
 agccgggtaca gcaagaagt caagcccgag atcgccatca gacccaaagt gcgggaccag 720
 gaaggccgga tgaactacta ctggaccctg gtggagcccg gcgacaagat caccttcgag 780
 gccaccggca atctggtggt gccagatac gccttcgcca tggaaagaaa cgccggcagc 840
 ggcatcatca tcagcgacac ccccggtcac gactgcaaca ccactgtca gaccccaag 900
 ggggccatca acaccagct gccctccag aacatccacc ccatcacat cggcaagtgc 960
 cctaagtacg tgaagtccac caagctgaga ctggccaccg gcctgcggaa catcccagc 1020
 atccagagca gaggcctgtt cggggccatt gccggctta tcgagggcgg ctggaccgga 1080
 atggtggacg ggtggtacgg ctaccaccac cagaatgagc agggcagcgg ctacgccgcc 1140
 gacctaagt ccaacacagaa cgccatcgac gagatcacca acaaagtga cagcgtgatc 1200
 gagaagatga acaccagtt caccgccgtg ggcaaagagt tcaaccacct ggaaaagcgg 1260
 atcgagaacc tgaacaagaa ggtggacgac ggcttctgg acatctggac ctacaacgcc 1320
 gagctgctgg tgctgctgga aaacgagcgg acctggact accacgact caactggaag 1380
 aatctgtacg agaaagtgcg gagccagctg aagaacaacg ccaaagagat cggcaacggc 1440
 tgcttcgagt tctaccacaa gtgcgacaac acctgtatgg aaagcgtgaa gaacggcacc 1500
 tacgactacc ccaagtacag cgaggaagcc aagctgaacc gggaagagat cgacggcgtg 1560
 aagctgaaa gacccggat ctaccagatc ctggccatct acagaccgt gccagctca 1620
 ctggtcctgg tcgtgtccct gggcgtatc agctctgga tgtgcagcaa cggcagcctg 1680
 cagtgccgga tctgcatctg aggcgccgag aattctaat taa 1723

<210> 11
 < 211> 566
 < 212> PRT
 < 213> Virus de la gripe A

5

<400> 11
 Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

ES 2 614 802 T3

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

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

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

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

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

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

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro

ES 2 614 802 T3

275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
405 410 415

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

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

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

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

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

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

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
515 520 525

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

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

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 12
<211> 1432

ES 2 614 802 T3

< 212> ADN
< 213> Virus de la gripe A

<400> 12

atgaaccca accagaagat catcaccatc ggcagcgtgt gcatgacat eggcatggcc 60
aacctgatcc tgcatatcg caacatcatc agcatctgga tcagccacag catccagctg 120
ggcaaccaga accagatcga gacatgcaac cagagcgtga tcacctacga gaacaacacc 180
tgggtgaacc agacctcgt gaacatcagc aacaccaact tcgccgctgg ccagagcgtg 240
gtgtctgta agctggccgg caacagcagc ctgtgccctg tgcctggctg ggccatctac 300
agcaaggaca acagcgtgcg gatcggcagc aaggggcagc tgttcgtgat ccgggagccc 360
ttcatcagct gcagcccct ggaatgccgg accttcttc tgaccagggg ggcctgctg 420
aacgacaagc acagcaacgg caccatcaag gacagaagcc cctaccggac cctgatgagc 480
tgccccatcg gcgaggtgcc cagcccctac aacagcagat tcgagtcctg ggcttgagc 540
gcctctgct gccacgacgg catcaactgg ctgacaatcg gcatcagcgg cctgataac 600
ggcgtgtgg ccgtgtgaa gtacaacggc atcatcaacc acacaatcaa gagctggcgg 660
aacaacatc tgcggacca ggaatccgag tgcctcggc tgaacggcag ctgcttacc 720
gtgatgaccg acggccctag caatggccag gccagctaca agatctccg gatcgagaag 780
ggcaagatcg tgaagtcctg ggagatgaa gcccccaact accctacga ggaatgcagc 840
tgctaccccg acagcagcga gatcacctgt gtgtgccggg acaactggca cggcagcaac 900
agacctggg tgccttcaa ccagaatcg gaataccaga tcggtacat ttgcagcggc 960
atcttcggc acaacccag acccaacgac aagaccgaa gctgcggccc tgtgtctagc 1020
aacggggcca acggcgtgaa gggctcagc tcaagtacg gcaatggcgt gtggatcggc 1080
cggaccaaga gcatcagcag ccggaacggc ttcgagatga tetgggacc caacggctgg 1140
accggcaccg acaacaact cagcatcaag caggacatcg tgggcatcaa cgagtggagc 1200

5

ggctacagcg gcagcttctg gcagaccct gagctgaccg gcctggactg catccggccc 1260
tgctttggg tggagctgat cagaggcaga cccaaagaga acaccatctg gaccagcggc 1320
agcagcatca gcttttcgg cgtgaacagc gacaccgtgg gctggtcttg gcccgatggg 1380
gccgagctgc ccttaccat cgacaagtga ggcgcccaga attcttaatt aa 1432

<210> 13
< 211> 469
< 212> PRT
< 213> Virus de la gripe A

10

ES 2 614 802 T3

<400> 13

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

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

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

Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln
50 55 60

Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val
65 70 75 80

Val Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly
85 90 95

Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly
100 105 110

Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser Pro Leu Glu
115 120 125

Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His
130 135 140

Ser Asn Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser
145 150 155 160

Cys Pro Ile Gly Glu Val Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser
165 170 175

ES 2 614 802 T3

Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Asn Trp Leu Thr
180 185 190

Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr
195 200 205

Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu
210 215 220

Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr
225 230 235 240

Val Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe
245 250 255

Arg Ile Glu Lys Gly Lys Ile Val Lys Ser Val Glu Met Asn Ala Pro
260 265 270

Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ser Ser Glu Ile
275 280 285

Thr Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val
290 295 300

Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly
305 310 315 320

Ile Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Lys Thr Gly Ser Cys Gly
325 330 335

Pro Val Ser Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys
340 345 350

Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Ser Ser Arg
355 360 365

Asn Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp
370 375 380

Asn Asn Phe Ser Ile Lys Gln Asp Ile Val Gly Ile Asn Glu Trp Ser
385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp
405 410 415

Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys
420 425 430

Glu Asn Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val
435 440 445

Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro
450 455 460

Phe Thr Ile Asp Lys
465

ES 2 614 802 T3

<210> 14
 < 211> 1698
 < 212> ADN
 < 213> Virus de la gripe A

5

<400> 14
 atgaaaacca tcatcgccct gagctacatc ctgtgcctgg tgttcgccca gaagctgccc 60
 ggcaacgaca acagcaccgc caccctgtgc ctgggccacc acgccgtgcc caacggcacc 120
 atcgtcaaaa ccattacca tgatcagatc gaggtgacca acgccaccga gctggtgcag 180
 agcagcagca ccggcgcat ctgcgacagc ccccaccaga tcttgacgg cgagaactgc 240
 accctgatcg acgctctgct cggcgaccct cagtgcgacg gcttcagaa caagaagtgg 300
 gacctgttcg tcgagcgcag caaggcctac agcaactgct acccctacga cgtgcccgac 360
 tacgccagcc tccgtccct ggtgcctcc agcggcacc ttgagttcaa cgacgagagc 420
 ttcaactgga ccggcgtgac ccagaacggc accagcagca gctgcaagcg ccgcagcaac 480
 aacagcttct tcagccgct gaactggctg acccactga agttcaagia ccccgccctg 540
 aactgacca tgcccaaca tgagaaattc gacaagtgt acatctgggg cgtgcaccac 600
 cccgtgaccg acaacgacca gatcttctg tacgcccagg ccagcggccg catcaccgtg 660
 agcaccaagc gcagccagca gaccgtgatc cccaacatcg gcagccgccc caggatccgc 720
 aacatcccca gccgcatcag catctactgg accatcgtga agcccgccga catctgctg 780
 atcaactcca ccggcaacct gatcgcccc aggggctact tcaagatccg cagcggcaag 840
 agcagcatca tgcgcagcga cgccccatc ggcaagtgca acagcagtg catcaccccc 900
 aacggcagca tccccacga caagccctc cagaacgtga accgcatcac ctacggagcc 960
 tgtccccgt acgtgaagca gaacacccg aaactggcta ccggcatgcg gaactgccc 1020
gagaagcaga cccggggcat ctccggggcc atcgccggct tcatcgagaa cggctgggag 1080
 ggcatggtgg acgggtggta tggcttcgc caccagaact ccgagggcat cggccaggcc 1140
 gccgacctga agagcaccca ggccgccatc aaccagatca acggcaagct gaaccgctg 1200
 atcggcaaga ccaacgagaa gttccaccag atcgagaagg agtttagcga ggtcgagggc 1260
 cgcattccagg acctggagaa gtactgtgag gacaccaaga tcgacctgtg gagctacaac 1320
 gccgagctgc tggctgccct ggagaaccag cacaccatcg acctgaccga cagcagatg 1380
 aacaagctgt tcgagcgcac caagaagcag ctgcgcgaga acgccgagga catgggcaac 1440
 ggctgcttca agatctacca caagtgcgac aacgcctgca tcggctccat ccgcaacggc 1500
 acctacgacc acgacgtgta ccgcgacgag gcctgaaca accgcttcca gatcaagggc 1560
 gtggagctga agagcggcta caaggactgg atcctgtgga tcagcttcgc tatcagctgc 1620
 ttctgtgtg gcgtggccct gctgggcttc atcatgtggg cctgccagaa gggcaacatc 1680
 cgtgcaaca tctgcatc 1698

10

<210> 15
 < 211> 566
 < 212> PRT
 < 213> Virus de la gripe A

ES 2 614 802 T3

<400> 15

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Gly Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val

ES 2 614 802 T3

115	120	125	
Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asp Glu Ser Phe Asn Trp Thr			
130	135	140	
Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ser Cys Lys Arg Arg Ser Asn			
145	150	155	160
Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Phe Lys			
165	170	175	
Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys			
180	185	190	
Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Asn Asp Gln Ile			
195	200	205	
Phe Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg			
210	215	220	
Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Ile Arg			
225	230	235	240
Asn Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly			
245	250	255	
Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly			
260	265	270	
Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala			
275	280	285	
Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile			
290	295	300	
Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala			
305	310	315	320
Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met			
325	330	335	
Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala			
340	345	350	
Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly			
355	360	365	

ES 2 614 802 T3

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
370 375 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
385 390 395 400

Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
450 455 460

Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 16

< 211> 1410

< 212> ADN

< 213> Virus de la grippe A

ES 2 614 802 T3

<400> 16
atgaacccca accagaagat catcaccatc g gatccgtca g cctgacat ctcaccatc 60
tgcttttca tgcagatgc catcctgatc accaccgtga cctgcaact caagcagtac 120
gagttcaaca gccccccaa caaccaggtc atgtgtgctg agcccacat catcgagcgc 180
aacatcaccg agatcgtgta cctgaccaac accaccatcg agaaagagat ctgcccgaag 240
ctggccgagi accgcaactg gtccaagccc cagtgaata tcacaggctt cgccccctc 300
agcaaggaca acagatccg cctgagcgtc ggaggggaca tctgggtcac ccgagagccc 360
tactgagct gcgacccga caagtgtac cagtgcgcc tcggacaggg gaccactg 420
aataacgtcc acagcaacga caccgtgac gaccgaccc cctaccgac cctgtgatg 480
aacgagctgg gcgtgccctt ccacctgggc accaagcagg tctgcatgc ctggtccagc 540
agcagctgcc acgacggcaa ggcctggctg cacgtgtgctg tgaccggcga cgacaagaac 600
gccaccgca gcttcatcta caacggccgc ctggtggaca gcatcgtgag ctggtccaaa 660
gagatcctgc gcaccaaga aagcgagtgc gtctgcatca acggcacctg caccgtggtg 720
atgaccgagc gcagcgcctc cggcaaggcc gacaccaaga tctgttcat cgaagagggc 780
aagatcgtgc acaccagcac actgtccggc agcgcaccagc acgtggaaga gtgcagctgc 840
taccctcgtc acctgggctg gcgctgctg tgcccgaca actggaaggg cagcaaccgc 900
cccctcgtg acatcaacat caaggactac tccatcgtga gcagctacgt gtgcagcggc 960
ctggtcggcg acacaccccg caagaacgac agcagctcca gcagccactg cctggacccc 1020
aacaacgaag agggcgccca cggcgtgaag ggctgggctc tcgacgacgg caacgacgtg 1080
tggatgggcc gcacatcag cgagaagctg cggagcggct atgagacatt caaggtgatc 1140
gagggctggt ccaaccccaa cagcaagctg cagatcaacc gccaggtgat cgtggaccgc 1200
ggcaaccgct ccggtacag cggcatcttc agcgtggagg gcaagtctg catcaaccgc 1260
tgctctatg tggagctgat tcgggggagg aaagaagaga ccgaggtcct ctggaccagc 1320
aacagcatcg tgggttctg cggcaccage ggcacctac gcaaccgag ctggcccagc 1380
ggggccgaca tcaacctgat gccatctga 1410

<210> 17
< 211> 469
< 212> PRT
< 213> Virus de la gripe A

<400> 17
Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr
1 5 10 15

5

ES 2 614 802 T3

Ile Ser Thr Ile Cys Phe Phe Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Thr
 20 25 30

Val Thr Leu His Phe Lys Gln Tyr Glu Phe Asn Ser Pro Pro Asn Asn
 35 40 45

Gln Val Met Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu
 50 55 60

Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys
 65 70 75 80

Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asn Ile Thr Gly
 85 90 95

Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly
 100 105 110

Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys
 115 120 125

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Val His
 130 135 140

Ser Asn Asp Thr Val His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met
 145 150 155 160

Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile
 165 170 175

Ala Trp Ser Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val
 180 185 190

Cys Val Thr Gly Asp Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn
 195 200 205

Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Val Ser Trp Ser Lys Glu Ile Leu Arg
 210 215 220

Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val
 225 230 235 240

Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe
 245 250 255

Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Thr Ser Thr Leu Ser Gly Ser Ala

ES 2 614 802 T3

260 265 270

Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Leu Gly Val Arg
275 280 285

Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp
290 295 300

Ile Asn Ile Lys Asp Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly
305 310 315 320

Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser Ser His
325 330 335

Cys Leu Asp Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp
340 345 350

Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu
355 360 365

Lys Leu Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser
370 375 380

Asn Pro Asn Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Arg
385 390 395 400

Gly Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser
405 410 415

Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Glu
420 425 430

Glu Thr Glu Val Leu Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly
435 440 445

Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile
450 455 460

Asn Leu Met Pro Ile
465

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de polinucleótidos que codifican proteínas del virus de la gripe procedentes de una cepa H1N1 y una cepa H3N2 para la preparación de una composición inmunogénica o un componente de vacuna contra infecciones de la gripe A en seres humanos y cerdos, en donde los polinucleótidos codifican hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y proteína matriz (M) y la nucleoproteína (NP) en donde los polinucleótidos codifican SEQ ID NO: 11 y 13 y SEQ ID NO: 6 y 8 o 9 y en donde las secuencias de ADN o ARN contienen codones que están optimizados para la expresión en células de mamífero.
2. El uso según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente polinucleótidos que codifican SEQ ID NO: 15 y 17.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los codones de ADN o ARN están optimizados, usando codones de proteínas humanas con expresión elevada.
4. El uso según la reivindicación 3, en donde los polinucleótidos se seleccionan a partir de SEQ ID NO: 5, 7, 10, 12 y 14.
- 15 5. Una vacuna contra infecciones de la gripe A de seres humanos y/o cerdos que comprende polinucleótidos que codifican proteínas del virus de la gripe procedentes de una cepa H1N1 y una cepa H3N2, en donde los polinucleótidos codifican hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y proteína matriz (M) y la nucleoproteína (NP) en donde los polinucleótidos codifican SEQ ID NO: 11 y 13 y SEQ ID NO: 6 y 8 o 9, y en donde las secuencias de ADN o ARN contienen codones que están optimizados para una expresión en células de mamífero.
6. Una vacuna según la reivindicación 5, en donde los polinucleótidos codifican SEQ ID NO: 6, 8, 11, 13 y 15.
- 20 7. Una vacuna según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde los codones están optimizados usando codones de proteínas humanas con expresión elevada.
8. Una vacuna según la reivindicación 5, en donde los polinucleótidos se seleccionan a partir de SEQ ID NO: 5, 7, 10, 12 y 14.
- 25 9. Una vacuna según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, que comprende adicionalmente polinucleótidos que codifican SEQ ID NO: 2, 4 o 17.
10. Una vacuna según la reivindicación 9, en donde los polinucleótidos se seleccionan a partir de SEQ ID NO: 1, 3 o 16.
11. Una vacuna según la reivindicación 5, en donde algunos o todos los codones que codifican Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, están modificados.
- 30 12. Una vacuna según las reivindicaciones 5 a 11, en donde la vacuna se administra mediante inyección de ADN y/o ARN desnudo con o sin electroporación o se inocula mediante una pistola de genes.
13. Una vacuna según las reivindicaciones 5 a 11, en donde los genes de la vacuna se administran incorporados en cuerpos apoptóticos celulares o en un virus vivo o bacteria.
- 35 14. Una vacuna según la reivindicación 13, en donde el virus vivo se selecciona a partir de adenovirus, poxvirus, virus adenoasociado, alfavirus y virus herpes.
15. Una vacuna según la reivindicación 13, en donde la bacteria se selecciona a partir de especies de Shigella o especies de Salmonella o especies de Lactobacillus o especies de Lactococcus.

Figura 1

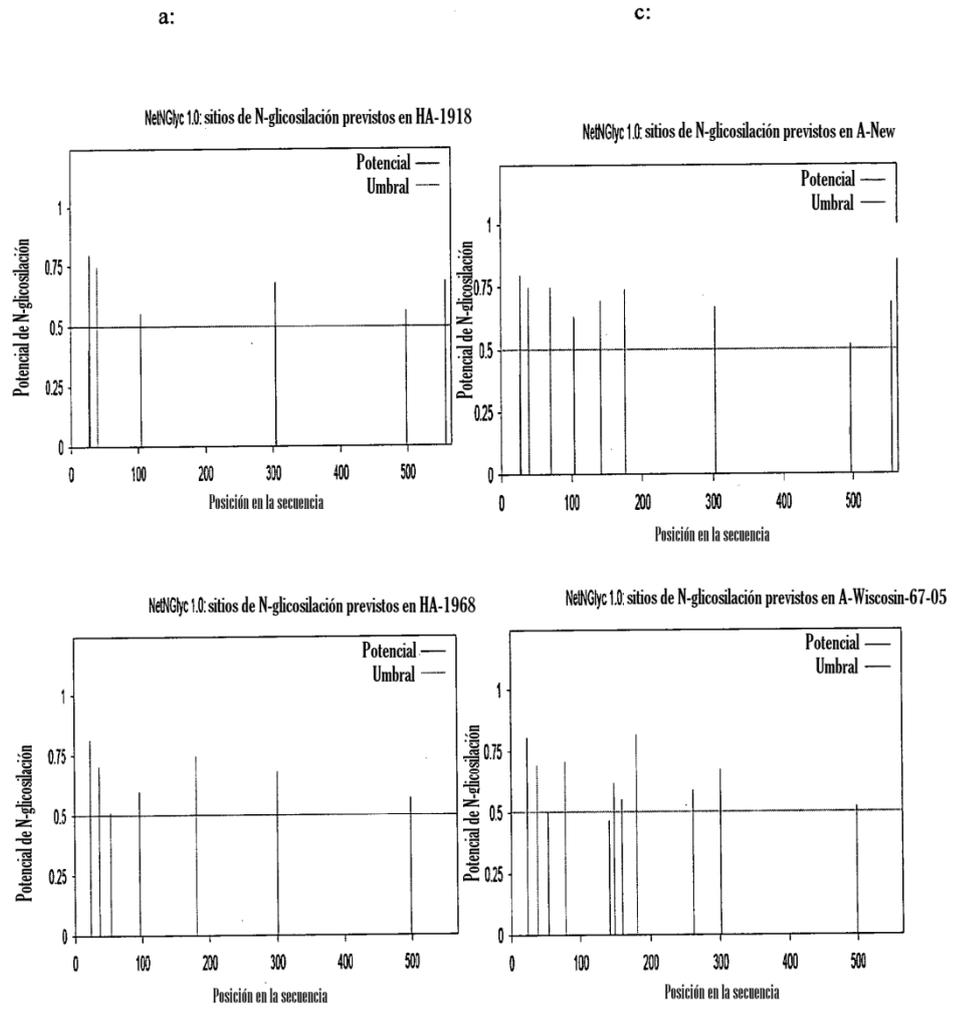
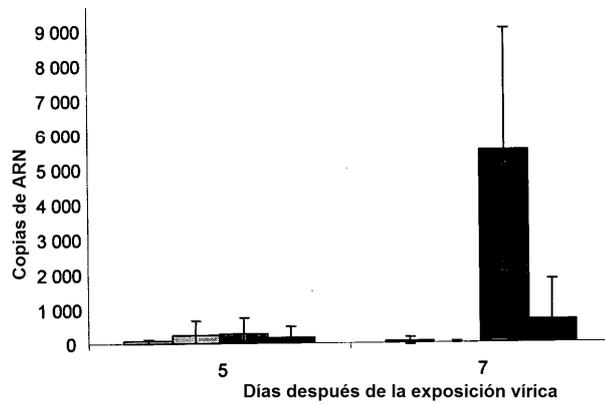
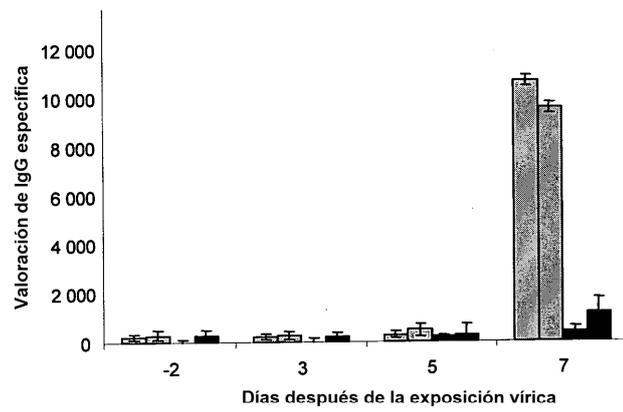


Figura 2



- ADN de HA y NA de H1N1 de 1918
- ▨ ADN de HA, NA, NP y M2 de H1N1 de 1918
- Plásmido vacío
- ADN de HA y NA de H1N1 A/New Caledonia/20/99

Figura 3

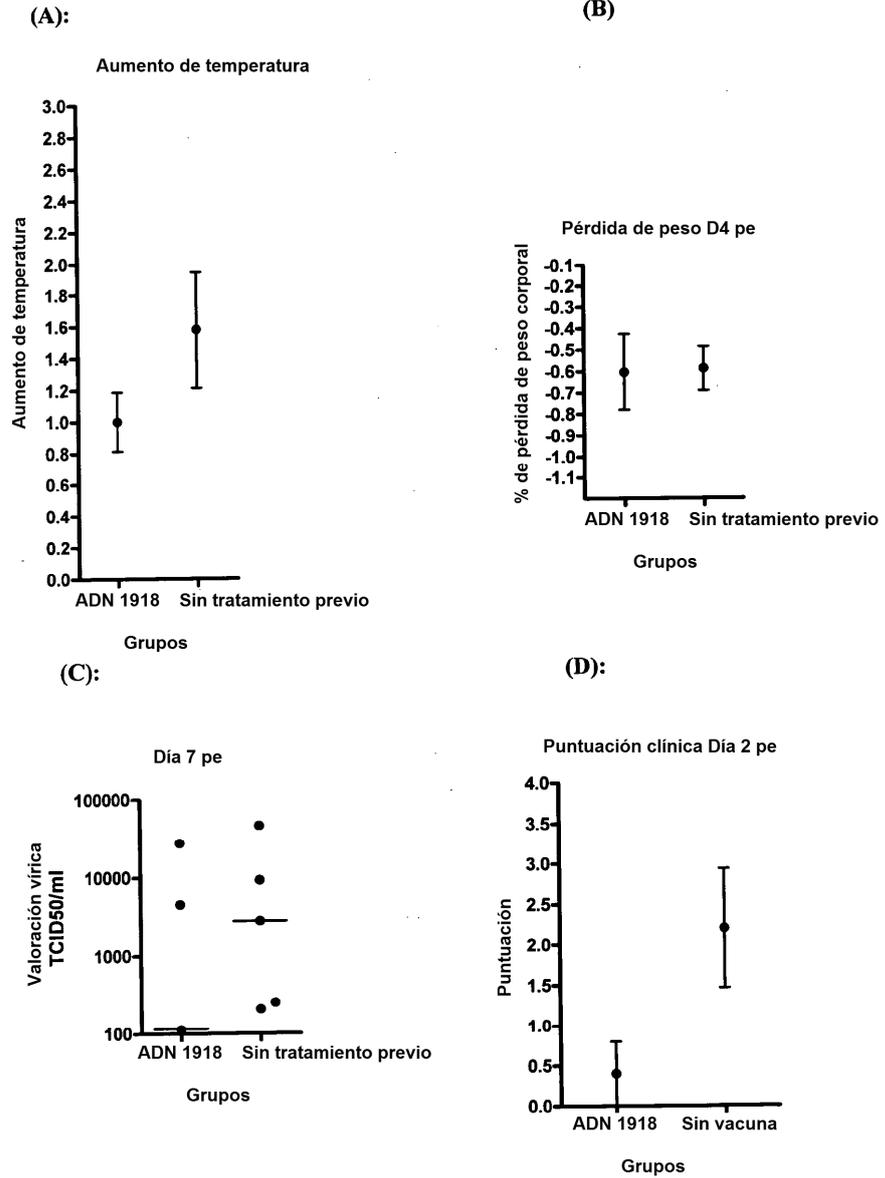


Figura 4

Hemoadsorción a 415 nm

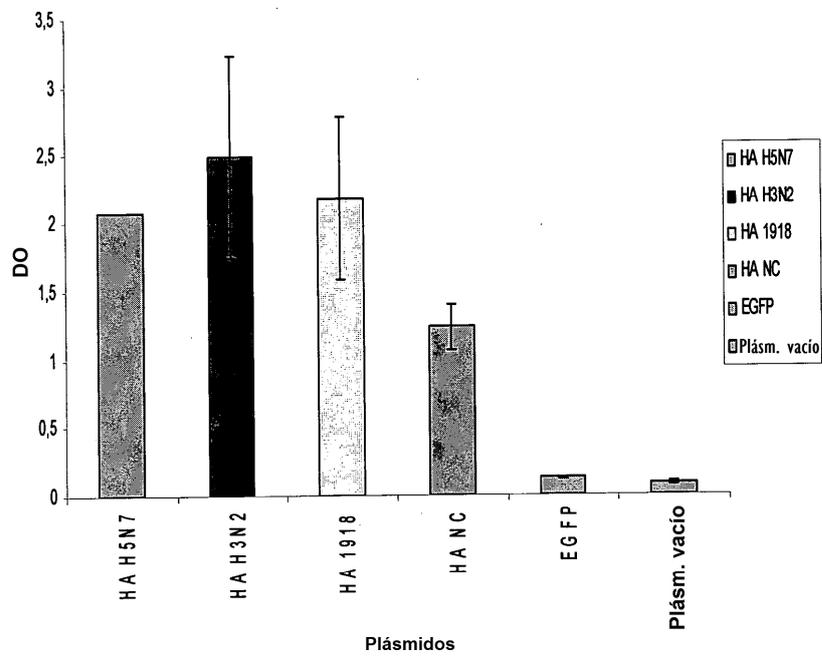


Figura 5

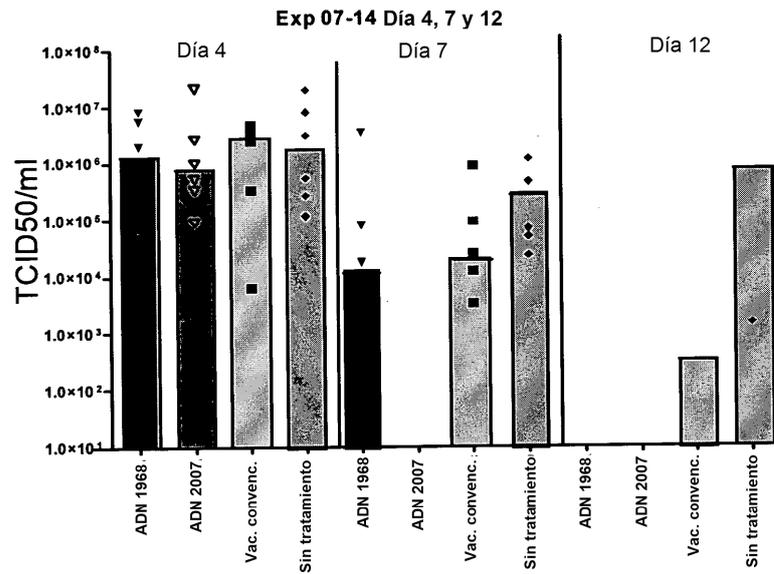


Figura 6

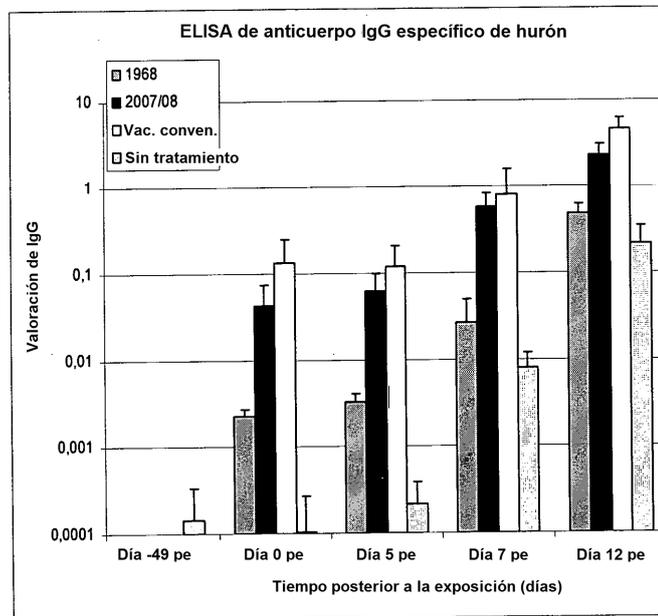
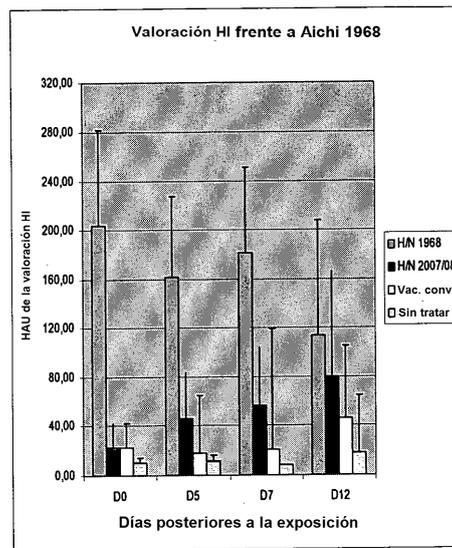


Figura 7

A:



B:

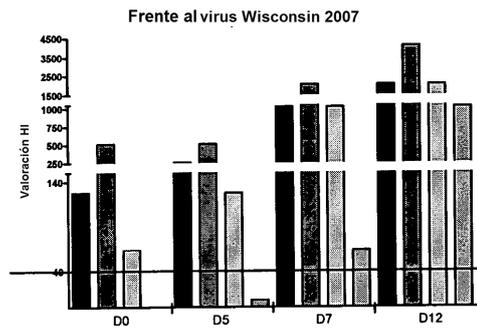


Figura 8

Valoración vírica en lavado nasal posterior a la exposición

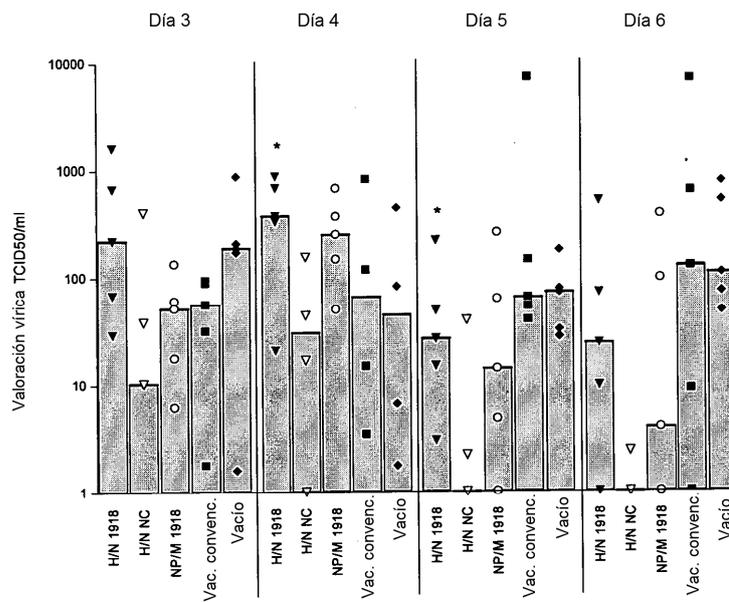


Figura 9

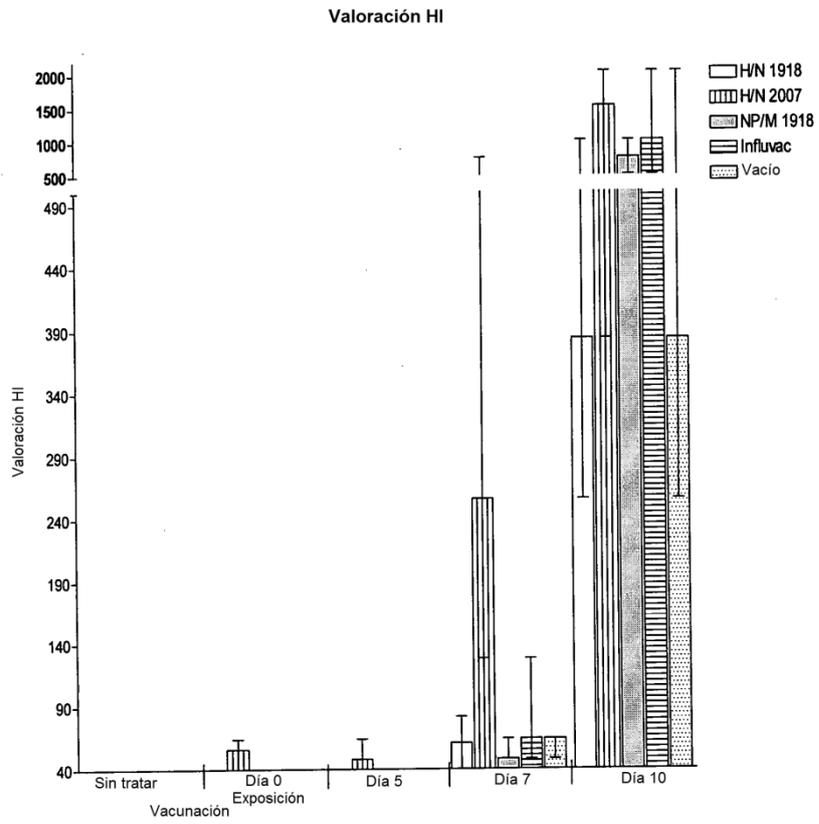


Figura 10

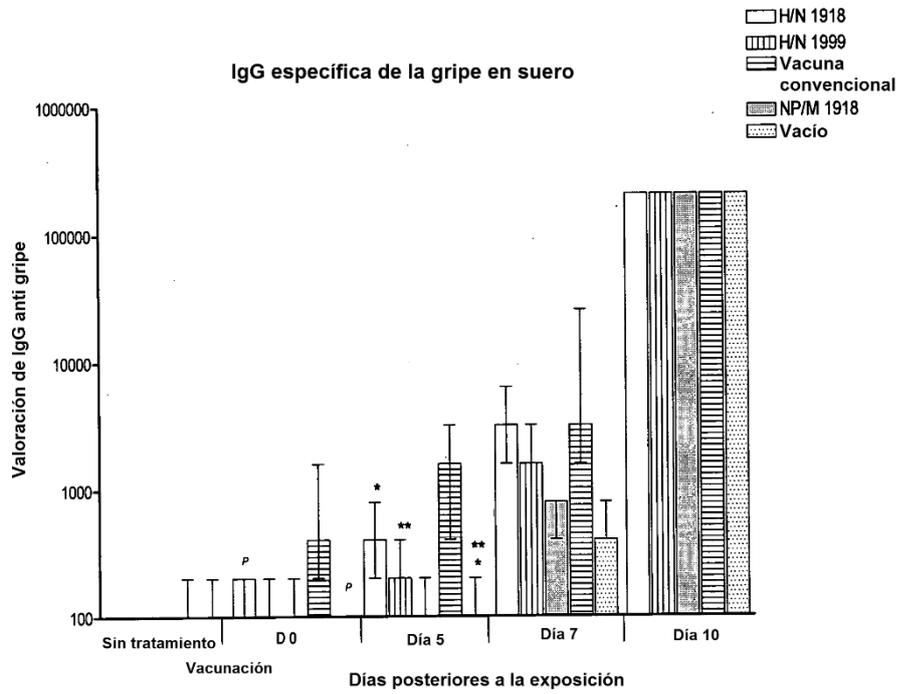


Figura 11

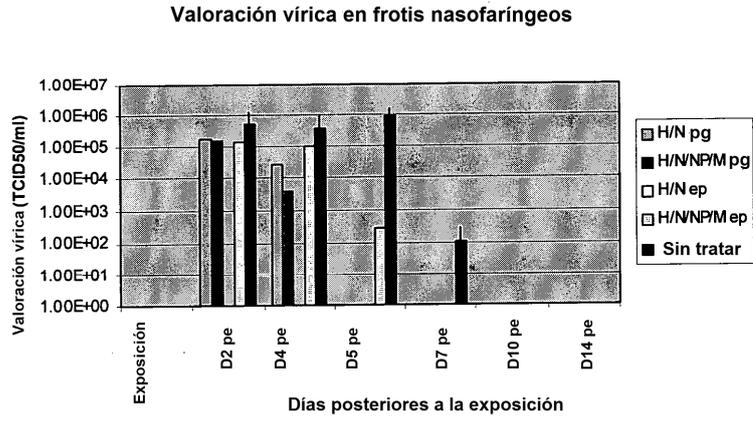


Figura 12

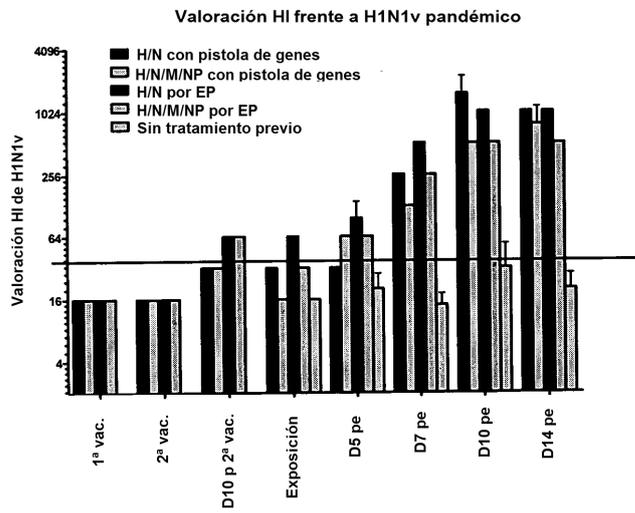


Figura 13

