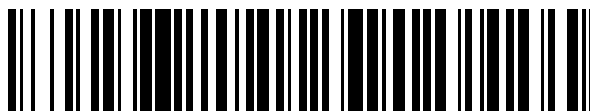


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 301**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2013 PCT/EP2013/054227**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13087945**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2013 E 13712156 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2820126**

54 Título: **Recombinación de virus de gripe**

30 Prioridad:

02.03.2012 US 201261605922 P
23.03.2012 US 201261685766 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

SEQIRUS UK LIMITED (100.0%)
Point Level 3, 29 Market Street
Maidenhead, Berkshire SL6 8AA, GB

72 Inventor/es:

SUPHAPHIPHAT, PIRADA;
MASON, PETER;
KEINER, BJÖRN;
DORMITZER, PHILIP RALPH y
TRUSHEIM, HEIDI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 628 301 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

Recombinación de virus de gripe

Campo técnico

5 La presente invención se encuentra en el campo de intercambio de virus de gripe A. además, se relaciona con la fabricación de vacunas para proteger contra virus de gripe A.

Técnica anterior

10 La protección más eficiente contra infección de gripe es la vacuna contra cepas circulantes y es importante producir virus de gripe para la producción de vacunas lo más rápido posible.

15 Los virus de gripe de tipo salvaje a menudo crecen a títulos bajos en huevos y cultivo celular. Con el fin de obtener la cepa de virus que mejor crezca para la producción de vacunas en la actualidad es común la práctica de recombinación de cepas circulantes de vacuna con una cepa donante de alto rendimiento y de rápido crecimiento. Esto puede conseguirse co-infectando un huésped de cultivo con la cepa de gripe circulante (la cepa de la vacuna) y con la cepa donante de alto rendimiento y seleccionando los virus recombinantes que contienen los segmentos de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de la cepa de la vacuna y los otros segmentos virales (esto es, aquellos que codifican PB1, PB2, PA, NP, M₁, M₂, NS₁ y NS₂) de la cepa donante. Otra técnica es recombinar los virus de gripe mediante genética inversa (véase, por ejemplo, referencias 1 y 2).

20 La referencia 2 presenta que un virus de gripe recombinantes que contiene un segmento de gen PB1 de A/Texas/1/77, los segmentos HA y NA de A/New Caledonia/20/99, un segmento PA modificado derivado de A/Puerto Rico/8/34 y el resto de segmentos virales de A/Puerto Rico/8/34 muestran un mayor crecimiento en células.

25 Más virus recombinantes de gripe se describen en Abt et al Vaccine 29(32):5153-5162 (Mayo 2011), Fluvini e tal PLOS ONE 6(6) (Junio 2011) y WO2010/077986.

30 En la actualidad hay solamente un número limitado de cepas donantes para virus recombinantes de gripe para fabricación de vacunas, y la cepa más comúnmente usada es la cepa A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34). Sin embargo, los virus recombinantes de gripe que contienen segmentos del eje central de A/PR/8/34 no siempre crecen lo suficientemente bien para asegurar una fabricación de vacuna eficiente. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proporcionar cepas donantes adicionales y mejoradas para recombinación de virus de gripe.

35 Resumen de realizaciones preferentes

40 Los inventores ahora han descubierto inesperadamente que los virus de gripe que comprenden segmentos del eje central de dos cepas donantes de gripe pueden crecer más rápido en un huésped de cultivo en comparación con virus recombinantes de gripe A que contienen todos los segmentos del eje central de la misma cepa donante. En particular, los inventores han encontrado que los virus de gripe que comprenden los segmentos del eje central derivados de dos cepas donantes de alto rendimiento pueden producir recombinantes de mayor rendimiento con genes HA/NA relevantes de la vacuna diana que los recombinantes hechos con cualquiera de las dos cepas donantes originales.

45 En principio, todos los segmentos de virus de gripe A muy relacionados pueden recombinarse específicamente para producir virus viables, pero solamente una pequeña fracción de estos virus será recombinantes con alto crecimiento, debido a las actividades ineficientes de los componentes virales resultantes. Los inventores han proporcionado combinaciones del eje central que producen cepas de alto rendimiento.

50 La invención proporciona un virus recombinante de gripe A que puede crecer hasta títulos más altos virales en células MDCK en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento en comparación con A/Puerto Rico/8/34, donde el virus recombinante de gripe A comprende segmentos del eje central de dos cepas donantes, donde los segmentos virales de PB1 y PB2 son de la cepa donante 105p30y (a) tiene al menos 95% identidad con las secuencias de SEQ ID Nos: 18 y 19, o (b) codifican polipéptidos que tiene al menos 99% identidad con la secuencia de polipéptido codificada por SEQ ID Nos: 18 y 19, donde al menos un segmento viral del eje central del virus recombinante de gripe A es de la cepa donantes PR8-X, y donde:

55 a) el segmento PA del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 9 y 17, el segmento M del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 13 y 21, el segmento NP del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 12 y 20, el segmento NS del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 14 y 22; o

b) los segmentos virales del eje central codifican polipéptidos que tiene al menos 99% identidad con las secuencias de polipéptido codificadas por SEQ ID Nos: 12-14 o 20-22.

5 Los virus recombinantes de gripe A aquí desvelados que comprenden segmentos del eje central de dos o más cepas donantes de gripe pueden contener los segmentos virales PB1 y PB2 de la misma cepa donante, en particular la cepa del tipo A/New Caledonia/20/1999, aquí referida como la cepa 105p30. Los segmentos virales PB1 y PB2 pueden tener al menos 99% identidad o 100% identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3.

10 Donde los virus recombinantes de gripe A aquí desvelados comprenden segmentos del eje central de dos o más cepas donantes, cada cepa donantes puede proporcionar más de un segmento de eje central del virus recombinantes de gripe A, pero uno o más de las cepas donantes puede también proporcionar solamente un único segmento del eje central.

15 Donde los virus recombinantes de gripe A aquí desvelados comprenden segmentos del eje central de dos, tres, cuatro o cinco cepas donantes, una o dos de las cepas donantes pueden proporcionar más de un segmento de eje central del virus recombinantes de gripe A. En general, los virus recombinantes de gripe A no pueden comprender más de seis segmentos del eje central. Por consiguiente, por ejemplo, si una de las cepas donantes proporciona cinco de los segmentos virales, el virus recombinante de gripe A solo puede comprender segmentos del eje central de un total de dos cepas donantes diferentes.

20 Donde un virus recombinantes de gripe A aquí desvelado comprende el segmento PB1 de A/Texas/1/77, preferentemente no comprende el segmento PA, NP o M de A/Puerto Rico/8/34. Donde un virus recombinantes de gripe A aquí desvelado comprende el segmento PA, NP o M de A/Puerto Rico/8/34, preferentemente no comprende el segmento PB1 de A/Texas/1/77. La invención no abarca virus recombinantes de gripe A que tengan el segmento PB1 de A/Texas/1/77 y los segmentos PA, NP o M de A/Puerto Rico/8/34. El segmento PB1 de A/Texas/1/77 puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 46 y los segmentos PA, NP o M de A/Puerto Rico/8/34 pueden tener la secuencia de SEQ ID Nos 47, 48 o 49 respectivamente.

25 Los inventores también han descubierto que variantes de cepas donantes conocidas pueden crecer hasta títulos virales más altos en comparación con la cepa donante original y por lo tanto ser mejores cepas donantes para recombinar virus de gripe. Ejemplos de tales cepas son PR8-X y 105p30.

30 Las cepas de virus de gripe A de la invención pueden crecer a títulos virales más altos en células MDCK en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento en comparación con A/Puerto Rico/8/34 y/o tener mayor eficiencia de rescate en comparación con cepas recombinantes de gripe que comprenden todos los segmentos del eje central de la misma cepa donante de gripes. Como aquí se desvela es un virus recombinante de gripe A que comprende al menos un segmento viral del eje central de tal cepa de gripe.

35 Aquí también se desvela un virus recombinante de gripe A que comprende al menos un segmento viral del eje central de una cepa donante, donde la cepa donante se selecciona del grupo consistente en 105p30 y PR8-X. Cuando al menos un segmento viral del eje central es el segmento PA puede tener una secuencia que tiene al menos 95% o al menos 99% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 9 y 17. Cuando al menos un segmento viral del eje central es el segmento PB1, puede tener una secuencia que tiene al menos 95% o al menos 99% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 10 y 45 18. Cuando al menos un segmento viral del eje central es el segmento PB2, puede tener una secuencia que tiene al menos 95% o al menos 99% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 11 y 19. Cuando al menos un segmento viral del eje central es el segmento M puede tener una secuencia que tiene al menos 95% o al menos 99% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 13 y 21. Cuando al menos un segmento viral del eje central es el segmento NP puede tener una secuencia que tiene al menos 95% o al menos 99% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 12 y 50 20. Cuando al menos un segmento viral del eje central es el segmento NS puede tener una secuencia que tiene al menos 95% o al menos 99% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 14 y 22.

55 En casos donde el virus recombinante de gripe A comprende segmentos de al menos dos cepas donantes de gripe, al menos un segmento del eje central puede derivarse de una cepa donante seleccionada del grupo consistente en 105p30 y PR8-X, como se ha analizado en el párrafo anterior. Los virus recombinantes de gripe A aquí desvelados comprenden 1, 2, 3 o 4 segmentos virales de la cepa donante 105p30 donde el segmento PA puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 17, el segmento NP puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 20, el segmento M puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 21 y el segmento NS puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 22. Tales virus de gripe A también comprenden al menos un segmento viral del eje central de la cepa donante PR8-X. Donde el al menos un segmento viral es el segmento PA puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 9. Donde el al menos un segmento viral es el segmento NP puede tener al menos 95% 60 identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 12. Donde el al menos un segmento viral es el segmento M puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 13. Donde el al menos un segmento viral es el segmento

NS puede tener al menos 95% identidad o 100% identidad con SEQ ID NO: 9. Los inventores han mostrado que los virus recombinantes de gripe A que comprenden tales segmentos del eje principal crecen bien en cultivo celular. En general, un virus recombinante de gripe contendrá solamente uno de cada segmento del eje principal. Por ejemplo, cuando el virus de gripe comprende el segmento PA de 105p30 no comprenderá al mismo tiempo el segmento PA de PR8-X.

En realizaciones preferentes, el virus comprende segmentos virales que tienen al menos 95% identidad o 100% identidad con la secuencia de a) el segmento PB2 de SEQ ID NO: 19, el segmento PB1 De SEQ ID NO: 18 y el segmento NS de SEQ ID NO: 22; o (b) el segmento PB2 de SEQ ID NO: 19, el segmento PB1 De SEQ ID NO: 18 y el segmento M de SEQ ID NO: 21; o (c) el segmento PB2 de SEQ ID NO: 19, el segmento PB1 De SEQ ID NO: 18 y el segmento NP de SEQ ID NO: 20; o (d) el segmento PB2 de SEQ ID NO: 19, el segmento PB1 De SEQ ID NO: 18 y el segmento PA de SEQ ID NO: 17. Estas realizaciones son preferentes porque los inventores han descubierto que tales virus recombinantes de gripe A crecen particularmente bien en cultivo celular.

La invención proporciona un método para preparar los virus recombinantes de gripe A de la invención. Estos métodos comprenden las etapas de (i) introducir en un huésped de cultivo una o más construcciones expresión que codifica(n) los segmentos virales requeridos para producir el virus de gripe A de la invención donde los segmentos virales del eje principal son de dos o más cepas de gripe; y (ii) cultivar el huésped de cultivo con el fin de producir virus recombinante y opcionalmente (iii) purificar el virus obtenido en la etapa (ii).

El método puede comprender las etapas de (i) introducir en un huésped de cultivo una o más construcciones expresión que codifica(n) los segmentos virales requeridos para producir el virus de gripe A de la invención donde los segmentos virales del eje principal son de dos o más cepas de gripe y los segmentos PB1 y PB2 son de la misma cepa donante; y (ii) cultivar el huésped de cultivo con el fin de producir virus recombinante y opcionalmente (iii) purificar el virus obtenido en la etapa (ii).

También se proporciona un método para preparar un virus recombinante de gripe A de la invención que comprende las etapas de (i) introducir en un huésped de cultivo una o más construcciones expresión que codifica(n) los segmentos virales requeridos para producir el virus de gripe A de la invención donde los segmentos virales del eje principal son de dos o más cepas de gripe y los segmentos HA y PB1 son de diferentes cepas de gripe que tiene el mismo subtipo HA de gripe; y (ii) cultivar el huésped de cultivo con el fin de producir virus recombinante y opcionalmente (iii) purificar el virus obtenido en la etapa (ii).

La invención también proporciona un método para preparar un virus recombinante de gripe A de la invención que comprende las etapas de (i) introducir en un huésped de cultivo una o más construcciones expresión que codifica(n) los segmentos virales requeridos para producir el virus de gripe A de la invención donde los segmentos virales del eje principal son de una cepa de gripe 105p30 y/o PR8-X y donde al menos un segmento viral se deriva de una segunda cepa de gripe; y (ii) cultivar el huésped de cultivo con el fin de producir virus recombinante y opcionalmente (iii) purificar el virus obtenido en la etapa (ii).

Los métodos pueden además comprender las etapas de: (iv) infectar un huésped de cultivo con el virus obtenido en la etapa (ii) o etapa (iii); (v) cultivar el huésped de cultivo de la etapa (iv) para producir más virus; y opcionalmente (vi) purificar el virus obtenido en la etapa (v).

La invención también proporciona un método para producir virus que comprende las etapas de (a) infectar un huésped de cultivo con un virus recombinante de la invención; (b) cultivar el huésped de la etapa (a) para producir el virus; y opcionalmente (c) purificar el virus obtenido en la etapa (b).

La invención también proporciona un método para preparar una vacuna, que comprende las etapas de (d) preparar un virus mediante los métodos de una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente y (e) preparar una vacuna a partir del virus.

Aquí también se desvelan las cepas de gripe PR8-X y 105p30.

Aquí también se desvelan cepas de virus de gripe variante H1N1 donde el segmento de genoma M tiene lisina en la posición correspondiente al aminoácido 95 de SEQ ID NO: 33 cuando se alinea con SEQ ID NO: 33 usando un algoritmo de alineamiento de pares. Las cepas de virus de gripe variante H1N1 pueden además tener un segmento HA que tiene glicina en la posición correspondiente al aminoácido 225 de SEQ ID NO: 35 cuando se alinea con la SEQ ID NO: 35 y/o tiene asparagina en la posición correspondiente al aminoácido 231 de SEQ ID NO: 35 cuando se alinea con la SEQ ID NO: 35 usando un algoritmo de alineamiento de pares. La cepa de virus de gripe variante H1N1 también puede tener un segmento NA que tiene histidina en la posición correspondiente al aminoácido 70 de SEQ ID NO: 31 cuando se alinea con SEQ ID NO. 31 usando un algoritmo de alineamiento de pares.

El algoritmo de alineamiento de pares preferente es el algoritmo de alineamiento global Needleman-Wunsch [4] que usa parámetros estándares (por ejemplo, con penalización de apertura de hueco = 10,0, y con penalización

de extensión de hueco = 0,5, usando la matriz de clasificación EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa convenientemente en la herramienta *needle* en el paquete EMBOSS [5].

5 Aquí también se desvela un sistema de expresión que comprende una o más construcciones que comprenden los segmentos que codifican vARN de un virus de gripe A donde las construcciones de expresión codifican los segmentos virales del eje central de dos o más cepas donantes de gripe. Las construcciones de expresión pueden codificar los segmentos PB1 y PB2 de la misma cepa donante.

10 Aquí también se desvela un sistema de expresión que comprende uno o más construcciones de expresión que comprenden los segmentos que codifican vARN de una cepa 105p30 o PR8-X donde las construcciones de expresión comprenden al menos un segmento viral del eje central de la cepa 105p30 o PR8-X. Las construcciones de expresión pueden además comprender vARNs que codifican segmentos PB2, NP, NS, M y PA de PR8-X.

15 Aquí también se desvela una célula huésped que comprende los sistemas de expresión aquí desvelados. Estas células huéspedes pueden expresar un virus de gripe A de las construcciones de expresión en el sistema de expresión.

20 También se proporcionan as construcciones de expresión que pueden usarse en los sistemas de expresión de acuerdo con la divulgación. Por ejemplo, aquí también se desvela una construcción de expresión que codifica los segmentos del eje central de las cepas recombinantes de gripe de acuerdo con la invención en la misma construcción.

Cepas donantes

25 Las cepas donantes de gripe son cepas que típicamente proporcionan los segmentos del eje central en una virus recombinante de gripe, aunque algunas veces pueden también proporcionar el segmento HA o NA, pero no ambos, del virus. Sin embargo, normalmente tanto el segmento HA como NA en un virus recombinante de gripe será de la cepa de la vacuna.

30 Los inventores han descubierto inesperadamente que los virus de gripe que comprenden segmentos del eje central de dos o más cepas donantes de gripe pueden crecer hasta títulos más altos en cultivos celulares en comparación con virus recombinantes de gripe que contienen todos los segmentos del eje central de la misma cepa donante. Los inventores también han mostrado que este efecto se debe a la presencia de segmentos del eje central de dos cepas donantes y no requiere la presencia de segmentos virales con mutaciones específicas. Sin embargo, se consiguen resultados particularmente buenos con cepas de gripe A donde el segmento de genoma M tiene lisina en la posición correspondiente al aminoácido 95 de SEQ ID NO: 33 cuando se alinea con SEQ ID NO: 33.

40 Los virus recombinantes de gripe A que comprenden los segmentos PB1 y PB2 de la misma cepa de gripe (por ejemplo 105p30) también son ventajosos porque muestra una mejor eficacia de rescate en comparación con virus de gripe donde los segmentos PB1 y PB2 son de diferentes virus. Los segmentos PB1 y PB2 de 105p30 tienen la secuencia de SEQ ID Nos 18 y 19, respectivamente.

45 Los inventores también han mostrado que algunas cepas de virus de gripe pueden crecer hasta títulos virales más altos en células MDCK en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento en comparación con A/Puerto Rico/8/34.

50 Las variantes de cepas donantes de gripe que se deriva de las cepas donantes aquí desveladas u otras cepas donantes conocidas como A/PR/8/34 (wt PR8) también pueden ser útiles como cepas donantes. Estas cepas donantes pueden crecer hasta títulos virales más altos (en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento) en comparación con la cepa donante de la que se derivan. Por ejemplo, los inventores han descubierto inesperadamente de la cepa de gripe A/PR/8/34 varias veces en el cultivo celular da como resultado una cepa de virus (PR8-X) que crecen hasta títulos virales mucho más altos en comparación con la cepa original A/PR8/34. De la misma manera, los inventores han descubierto que el paso de la cepa A/New Caledonia/20/1999 varias veces en célula da como resultado una cepa (105p30) que crece hasta títulos incluso más altos en comparación con la cepa que no pasó A/New Caledonia/20/1999 en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento. Las variantes de cepa donante de la presente invención conseguirán típicamente títulos virales que son al menos 10%, al menos 20%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 5000% o al menos 1000% más altos bajo las mismas condiciones de crecimiento y durante el mismo tiempo (por ejemplo 12 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas) en comparación con los títulos virales obtenidos con la cepa donante de la que se derivó la variante.

60 Los segmentos de PR8-X tiene las secuencias de: SEQ ID NO: 11 (PB2), SEQ ID NO: 10 (PB1), SEQ ID NO: 9 (PA), SEQ ID NO: 12 (NP), SEQ ID NO: 13 (M), SEQ ID NO: 14 (NS), SEQ ID NO: 15 (HA) O SEQ ID NO: 16 (NA).

65

Los segmentos de 105p30 tiene las secuencias de: SEQ ID NO: 19 (PB2), SEQ ID NO: 18 (PB1), SEQ ID NO: 17 (PA), SEQ ID NO: 20 (NP), SEQ ID NO: 21 (M), SEQ ID NO: 22 (NS), SEQ ID NO: 23 (HA) O SEQ ID NO: 24 (NA).

5 Las cepas de gripe que contienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de los segmentos de las cepas 105p30 o PR8-X pueden también usarse como cepas donantes.

10 La invención puede practicarse con cepas donantes que tienen al menos un segmento viral que tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% identidad con una secuencia de SEQ ID NOS 12-14 o 18-22. Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, es posible tener el mismo polipéptido codificado por varios ácidos nucleicos con diferentes secuencias. Así, la invención puede practicarse con segmentos virales que codifican los mismos polipéptidos como las secuencias de SEQ ID NOS 12-14 o 18-22. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID Nos: 3 y 28 tienen solamente 73% identidad aunque codifican la misma proteína viral.

La invención también puede practicarse con segmentos virales que codifican polipéptidos que tiene al menos 99% identidad con las secuencias de polipéptido codificadas por SEQ ID NOS 12-14 o 18-22.

20 Las variaciones en el ADN y en la secuencia de aminoácido pueden también surgir de mutaciones espontaneas que pueden ocurrir durante el paso de los virus. Tales cepas variantes de gripe también pueden usarse en la invención.

Virus recombinantes

25 La invención proporciona virus recombinantes de gripe que comprende segmentos del eje central de dos cepas donantes de gripe como se menciona en las reivindicaciones. Los segmentos PB1 y PB2 pueden ser de la misma cepa donante.

30 Aquí también se desvelan virus recombinantes de gripe que comprenden al menos un segmento viral del eje central de una cepa de virus de gripe que pueden crecer hasta títulos virales más altos en células MDCK en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento en comparación con A/Puerto Rico/8/34.

35 Aquí también se desvelan virus recombinantes de gripe que comprenden al menos un segmento viral del eje central de las cepas donantes, por ejemplo, una cepa PR8-X o 105p30. Los virus recombinantes de gripe aquí desvelados pueden recombinarse entre dos, tres, o más cepas diferentes de gripe siempre y cuando al menos un segmento viral se derive de una cepa donante.

40 Los virus de gripe son virus de cadena de ARN con segmento negativo. Los virus de gripe A y B tiene ocho segmentos (NP, M, NS, PA, PB1, HA y NA) mientras que los virus de gripe C tiene siete. Los virus recombinantes aquí desvelados contienen los segmentos del eje central de dos o más cepas donantes, o al menos un (esto es, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) segmento viral del eje central de las cepas donantes aquí desveladas. Los segmentos virales del eje central son aquellos que no codifican Ha o NA. Así, los segmentos del eje central codificarán típicamente los polipéptidos PB1, PB2, PA, NP, M₁, M₂, NS₁ y NS₂ del virus de gripe. Los virus recombinantes no contendrán típicamente los segmentos que codifican Ha y NA de las cepas donantes, aunque también se conciben los virus recombinantes que comprende Ha o NA pero no ambos de las cepas donantes aquí desveladas.

50 Cuando los virus recombinantes aquí desvelados son recombinantes que comprenden los segmentos del eje central de una única cepa donante, los virus recombinantes generalmente incluirán segmentos de la cepa donantes y la cepa de la vacuna en una proporción de 1:7, 2:6, 3:5, 4:4, 5:3, 6:2 o 7:1. Teniendo una mayoría de segmentos de la cepa donante, en particular una proporción de 6:2 es típica. Cuando los virus recombinantes comprenden segmentos de dos cepas donantes como se indica en la reivindicaciones, los virus recombinante incluirán generalmente segmentos de la primera cepa donante, la segunda cepa donante y la cepa de la vacuna en una proporción de 1:1:6, 1:2:5, 1:3:2:4, 1:5:2, 1:6:1, 2:1:5, 2:2:4, 2:3:3, 2:4:2, 2:5:1, 3:1:2, 3:2:1, 4:1:3, 4:2:2, 4:3:1, 5:1:2, 5:2:1 o 6:1:1.

60 Preferentemente, los virus recombinantes no contienen el segmento H1 de la cepa donante ya que ésta codifica los principales antígenos de vacuna del virus de la gripe y debería por lo tanto venir de la cepa de la vacuna. Los virus recombinantes de la invención tiene por lo tanto preferentemente al menos el segmento HA y típicamente los segmentos HA y NA de la cepa de la vacuna.

65 Aquí también se desvelan virus recombinantes que contiene segmentos virales de más de uno, por ejemplo de dos o tres cepas donantes diferentes donde al menos un segmento viral, preferentemente no HA, se deriva de las cepas de gripe PR8-X o 105p30. Tales virus recombinantes de gripe contendrán típicamente el segmento HA y/o NA de una cepa de vacuna. Donde los recombinantes contienen segmentos virales de más de una cepa donante de

gripe, las cepas donantes adicionales pueden ser cualquier cepa donantes que incluya las cepas donantes aquí desveladas. Por ejemplo, algunos de los segmentos virales pueden derivarse de las cepas de gripe A/PR/8/34 o AA/6/60 (A/Ann Arbor/6/60). Los recombinantes que contienen segmentos virales de la cepa AA/6/60 pueden ser ventajosos, por ejemplo, donde el virus recombinante se usará como una vacuna viva atenuada de gripe.

5 La invención también abarca recombinantes que comprenden segmentos virales de más de una cepa de vacuna siempre y cuando los recombinantes comprendan un eje central de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los virus recombinantes de gripe pueden comprender el segmento HA de una cepa donantes y el segmento NA de una cepa donante diferente.

10 Los virus recombinantes de la invención pueden crecer hasta títulos virales más altos que la cepa de vacuna de tipo salvaje de la que se derivan algunos de los segmentos virales del virus recombinantes en el mismo tiempo (por ejemplo 12 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas) y bajos las mismas condiciones de crecimiento. El título viral puede determinarse mediante métodos estándares conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los virus recombinantes de la invención pueden conseguir un título viral que sea al menos 10% más alto, al menos 20% más alto, al menos 50% más alto, al menos 100% más alto, al menos 200% más alto, al menos 500% más alto o al menos 1000% más alto que el título viral de la cepa de vacuna de tipo salvaje en el mismo marco de tiempo y bajo las mismas condiciones.

15 20 La invención es adecuada para recombinar cepas de vacuna de gripe pandémica así como inter-pandémica (estacional). Las cepas recombinantes de gripe pueden contener virus de gripe A HA subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, h10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Pueden contener el virus de gripe A NA subtipos N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. Donde la cepa de vacuna usada en los virus recombinantes de gripe de la invención es una cepa de gripe estacional, la capa de vacuna puede tener un subtipo H1 o H3. En un aspecto de la invención la cepa de vacuna es una cepa H1N1 o H3N2.

25 30 Las cepas de vacuna para su uso en la invención también pueden ser cepas endémicas o cepas potencialmente endémicas. Las características de una cepa de gripe que le dan el potencial para causar un brote pandémico son: (a) contiene una hemaglutinina nueva en comparación con la hemaglutininas en cepas humanas actualmente circulantes, es oes, una que n o ha sido evidente en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2) o no se ha visto previamente en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que generalmente solamente se han encontrado en poblaciones de pájaros), de manera que la población humana será inmunológicamente inexperto en la hemaglutinina de la cepa; (b) es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) es patogénico en humanos. Una cepa de vacuna con hemaglutinina tipo H5 es preferente donde el virus recombinantes se usa en vacunas para inmunizar contra gripe pandémica, como una cepa H5N1. Otras cepas posibles incluyen H5N3, H9N2, H7N1 y H7N7 y otras cepas pandémicas potencialmente emergentes. La invención es particularmente adecuada para producir virus recombinantes para su uso en vacunas para proteger contra cepas de virus pandémico potencial que pueden extenderse o haberse extendido desde una población animal no humana a humanos, por ejemplo, cepa de gripe H1N1 de origen porcino.

35 40 La cepa e gripe recombinante de la invención puede comprender el segmento HA y/o el segmento NA de una cepa A/California/4/09. Así, por ejemplo, el segmento de gen HA puede codificar una hemaglutinina H1 que es más relacionada con la SEQ ID NO: 32 que con la SEQ ID NO: 25 (esto es, tiene una identidad secuencial de mayor grado cuando se compara con la SEQ ID NO: 32 que con la SEQ ID NO: 25 usando el mismo algoritmo y parámetros). Las SEQ ID Nos: 32 y 25 son 80% idénticas. Similarmente, el gen NA puede codificar una neuraminidasa N1 que está más relacionada con la SEQ ID NO: 27 que con la SEQ ID NO: 26. Las SEQ ID Nos: 27 y 26 son 82% idénticas.

45 50 Las cepas que pueden usarse como cepas de vacuna incluyen cepas que son resistentes a terapia antiviral (por ejemplo, resistente a oseltamivir [6] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [7].

55 La elección de una cepa donante para su uso en los métodos de la invención puede depender de la cepa de vacuna que se esté recombinando. Como los recombinantes entre cepas distantes evolucionarias no pueden replicar bien en cultivo celular, es posible que la cepa donante y la cepa de vacuna tengan el mismo subtipo HA y/o NA. En otras realizaciones, en cambio, la cepa de vacuna y la cepa donante pueden tener diferentes subtipos HA y/o NA, y esta disposición puede facilitar la selección de virus recombinantes que contiene el segmento HA y/o NA de la cepa de vacuna. Por lo tanto, aunque las cepas 105p30 y PR8-X contienen el subtipo de gripe H1 estas cepas donantes pueden usarse para cepas de vacuna que no contienen el subtipo de gripe H1.

60 También pueden usarse recombinantes de las cepas donantes aquí desveladas donde el segmento HA y/o NA se ha cambiado a otro subtipo. El subtipo de gripe H1 de la cepa 105p30 o PR8-X puede cambiarse, por ejemplo, a un subtipo H3 o H5.

65 Así, la invención abarca un virus de gripe A que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete segmentos virales de las cepas 105p30 o PR8-X y un segmento HA que no es el subtipo H1. Las cepas donantes

recombinantes pueden además comprender un segmento NA que no es el subtipo N1. Las técnicas adecuadas para recombinar las cepas donantes serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

5 Aquí también se desvelan cepas donantes recombinantes que comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete segmentos virales de las cepas 105p30 o PR8-X y un segmento HA H1 que se deriva de una cepa diferente de gripe.

10 Los virus recombinantes que contienen un segmento NS que no codifica una proteína NS también están dentro del alcance de la presente invención. Los mutantes noqueados NSI se describen en la referencia 8. Estas cepas de virus mutantes NS1 son particularmente útiles para preparar vacunas de gripe atenuada.

La "segunda cepa de gripe" usada en los métodos de la invención es diferente de la cepa donante que se usa.

15 **Genética inversa**

La invención es particularmente útil para producir cepas de virus recombinante de gripe a través de técnicas de genética inversa. En estas técnicas, los virus se producen en huéspedes de cultivo usando un sistema de expresión.

20 En un aspecto, el sistema de expresión puede codificar los segmentos PB1 y PB2 de la misma cepa donante. En este aspecto de la invención, el sistema puede codificar al menos uno (esto es, uno, dos, tres o cuatro) de los segmentos NP, M, NS y/o PA de otra cepa donante de gripe.

25 En un aspecto, el sistema puede codificar 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) segmentos de genoma de la cepa PR8-X, pero normalmente éste/estos no incluirán el segmento PR8-X HA y normalmente no incluirá el segmento PR8-X NA. Así, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 (posiblemente los seis) de PR8-X.

30 El sistema puede codificar 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) segmentos de genoma de la cepa 105p30, pero normalmente éste/estos no incluirán el segmento 105p30 HA y normalmente no incluirá el segmento 105p30 NA. Así, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 (posiblemente los seis) de 105p30.

35 La genética inversa para virus de gripe A y B pueden practicarse con 12 plásmidos para expresar las cuatro proteínas necesarias para iniciar la réplica y transcripción (PB1, PB2, PA y nucleoproteína) y los ocho segmentos de genoma viral. Para reducir el número de construcciones, en cambio, puede incluirse una pluralidad de casetes de transcripción de polimerasa I de ARN (para síntesis viral de ARN) en un único plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o los ocho segmentos de gripe vARN) y una pluralidad de regiones que codifican proteína con promotores de polimerasa II de ARN en otro plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 transcripciones de gripe mARN) [9]. También es posible incluir uno o más segmentos vARN de gripe bajo el control de un promotor de polimerasa I y uno o más regiones que codifican proteína de gripe bajo el control de otro promotor, en particular un promotor de polimerasa II, en el mismo plásmido. Esto se hace preferentemente mediante plásmidos bi-direccionales.

45 Los aspectos preferentes del método de la referencia 9 incluyen: (a) regiones que codifican mARN de PB1, PB2 y PA en una única construcción de expresión; y (b) los 8 segmentos que codifican vARN en una única construcción de expresión. La inclusión de segmentos neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) en una construcción de expresión y los otros seis segmentos virales en otra construcción de expresión es particularmente preferente ya que cepas de virus de gripe recién emergentes normalmente tienen mutaciones en los segmentos NA y/o HA. Por lo tanto, la ventaja de tener los segmentos HA y/o NA en una construcción de expresión separada es que solamente el vector que comprende la secuencia HA y/o NA necesita sustituirse. Así, en un aspecto de la invención los segmentos HA y/o NA de la cepa de vacuna pueden incluirse en una construcción de expresión y los segmentos que codifican vARN de las cepas donantes, excluyendo los segmentos HA y/o NA, se incluyen en una construcción de expresión diferente. La invención puede usar una construcción de expresión que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis segmentos virales del eje central que codifican vARN de una cepa donante. La construcción de expresión puede no comprender segmentos virales de HA y/o NA que producen una proteína funcional de HA y/o NA.

60 Los sistemas conocidos de genética inversa implican la expresión de moléculas de ADN que codifican moléculas virales de ARN deseadas (vARN) de promotores de pol I, promotores de polimerasa bacteriana de ARN, promotores de polimerasa bacteriófago, etc. Como los virus de gripe requieren la presencia de polimerasa viral para completar el ciclo de la vida, los sistemas también pueden proporcionar estas proteínas, por ejemplo, el sistema puede comprender además moléculas de ADN que codifican proteínas de polimerasa virales de manera que la expresión de ambos tipos de ADN lleve al montaje de un virus infeccioso completo. También es posible suministrar la polimerasa viral como una proteína.

65

5 Donde se usa genética inversa para la expresión de vARN de gripe, será evidente para aquel experto en la técnica que el espacio suficiente de los elementos secuenciales con referencia entre sí es importante para que la polimerasa inicie la réplica. Es por lo tanto importante que la molécula de ADN que codifica el ARN viral está colocada correctamente entre el promotor de pol I y la secuencia de terminación, pero este posicionamiento está bien dentro de las capacidades de aquellos que trabajan con sistemas de genética inversa.

10 Con el fin de producir un virus recombinante, una célula debe expresar todos los segmentos del genoma viral que son necesarios para montar un virón. El ADN clonado en las construcciones de expresión para su uso en los métodos de la presente invención proporciona preferentemente todo el ARN viral y proteínas, pero también es posible usar un virus ayudante para proporcionar algo del ARN y proteínas, aunque los sistemas que no usan un virus ayudante son preferibles. Como el virus de gripe es un virus segmentado, el genoma viral normalmente se expresará usando más de una construcción de expresión en los métodos de la invención. Sin embargo, también se concibe combinar uno o más segmentos o incluso todos los segmentos del genoma viral en una única construcción de expresión.

15 En algunas realizaciones, también se incluirá una construcción de expresión que lleve a la expresión de una proteína accesorio en la célula huésped. Por ejemplo, puede ser ventajoso expresar una proteasa de serían no viral (por ejemplo, tripsina) como parte de un sistema de genética inversa.

20 **Construcciones de expresión**

25 Las construcciones de expresión usada en los métodos de la invención pueden ser construcciones de expresión uni-direccionales o bi-direccionales. Donde se usa más de un transgen en los métodos (ya sea en la misma construcción de expresión o en diferente) es posible usar expresión uni-direccional y/o bi-direccional.

30 Como los virus de gripe requieren una proteína para infectividad, es generalmente preferible usar construcciones de expresión bi-direccionales ya que se reduce el número total de construcciones de expresión requeridas por la célula huésped. Así, el método de la invención puede utilizar al menos una construcción de expresión bi-direccional donde un gen o cADN está situado entre un promotor corriente arriba de pol II y un promotor corriente abajo no endógeno de pol I. la transcripción del gen o cADN del promotor de pol II produce mARN viral con capuchón en sentido positivo que puede traducirse en una proteína, mientras que la transcripción del promotor de pol I no endógeno produce vARN en sentido negativo. La construcción de expresión bi-direccional puede ser un vector de expresión bi-direccional.

35 Las construcciones de expresión bi-direccionales contienen al menos dos promotores que impulsan la expresión en diferentes direcciones (esto es, de 5' a 3' y de 3' a 5') desde la misma construcción. Los dos promotores pueden unirse operativamente a diferentes cadenas del mismo ADN con doble cadena. Preferentemente, uno de los promotores es un promotor de pol I y al menos uno de los promotores es promotor de pol II. Esto es útil ya que el promotor de pol I puede usarse para expresar vARNs sin capuchón mientras que el promotor de pol II puede usarse para transcribir mARNs que pueden posteriormente traducirse a proteínas, permitiendo así la expresión simultánea de ARN y proteína desde la misma construcción. Donde más de una construcción de expresión se usa dentro de un sistema de expresión, los promotores pueden ser una mezcla de promotores endógenos y no endógenos.

40 Los promotores de pol I y pol II usado en las construcciones de expresión pueden ser endógenos a un organismo desde el mismo orden taxonómico desde el que se deriva la célula huésped. Alternativamente, los promotores pueden derivarse de un organismo en un orden taxonómico diferente al de la célula huésped. El término "orden" se refiere a la clasificación taxonómica convencional, y ejemplos de órdenes son primates, roedores, carnívoros, marsupiales, cetáceos, etc. Los humanos y chimpancés están en el mismo orden taxonómico (primates), pero los humanos y los perros están en diferentes órdenes (primates vs. Carnívoros). Por ejemplo, el promotor humano de pol I puede usarse para expresar segmentos virales en células de caninos (por ejemplo, células MDCK).

45 La construcción de expresión típicamente incluirá una secuencia de terminación de transcripción de ARN. La secuencia de terminación puede ser una secuencia endógena de terminación o una secuencia de terminación que no es endógena para la célula huésped. Las secuencias de terminación adecuadas serán evidente para aquellos expertos en la técnica e incluyen, aunque no se limitan a, secuencia de terminación de transcripción polimerasa I de ARN, la secuencia de terminación de transcripción depolimerasa II de ARN y ribozimas. Además, las construcciones de expresión pueden contener una o más señales de poliadenilización para ARNm, particularmente al final de un ge cuya expresión se controla mediante un promotor pol II.

50 Un sistema de expresión puede contener al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o al menos doce construcciones de expresión.

Una construcción de expresión puede ser un vector, como un plásmido u otra construcción episómica. Tales vectores comprenderán típicamente al menos un origen bacteriano y/o eucariótico de réplica. Además, el vector puede comprender un marcador seleccionable que permita la selección en células procarióticas y/o eucarióticas. Ejemplos de tales marcadores seleccionables son genes que confieren resistencia a antibióticos, como ampicilina o kanamicina. El vector puede además comprender uno o más sitios múltiples de clonación para facilitar la clonación de una secuencia de ADN.

Como una alternativa, la construcción de expresión puede ser una construcción de expresión lineal. Tales construcciones de expresión lineales no contendrán típicamente ninguna secuencia de amplificación y/o selección. Sin embargo, las construcciones lineales que comprenden tales secuencias de amplificación y/o selección pueden también usarse en los métodos de la presente invención. La referencia 10 describe una construcción de expresión lineal que describe construcciones de expresión lineales individuales para cada segmento viral. También es posible incluir más de uno, por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco o seis segmentos virales en la misma construcción de expresión lineal. Tal sistema se ha descrito, por ejemplo, en la referencia 11.

Las construcciones de expresión pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica. Tales métodos se describieron, por ejemplo, en la referencia 12. Donde la construcción de expresión es una construcción de expresión lineal, es posible la linealización antes de la introducción en la célula huésped utilizando un único sitio de enzima de restricción. Alternativamente, es posible sacar la construcción de un vector usando al menos dos sitios de enzima de restricción. Además, también es posible obtener una construcción de expresión lineal amplificándola usando una técnica de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, mediante PCR).

Las construcciones de expresión usadas en los métodos de la invención pueden ser construcciones de expresión no bacterianas. Esto significa que la construcción puede dirigir la expresión en una célula eucariótica de segmentos virales de ARN codificados en la misma, pero no incluye componentes que serían necesarios para la propagación de la construcción en bacterias. Así, la construcción no incluirá un origen bacteriano de réplica (ori), y normalmente no incluirá un marcador de selección bacteriano (por ejemplo, un marcador de resistencia antibiótica). Tales construcciones de expresión se describen en la referencia 13.

Las construcciones de expresión pueden prepararse mediante síntesis química. Las construcciones de expresión pueden prepararse por completo mediante síntesis química o en parte. Los métodos adecuados para preparar las construcciones de expresión mediante síntesis química se describen, por ejemplo, en la referencia 13.

Las construcciones de expresión pueden introducirse en células huéspedes usando cualquier técnica conocida por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las construcciones de expresión pueden introducirse en células huéspedes empleando electroporación, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, microinyección o bombardeo de micropartículas.

Células

El huésped de cultivo para su uso en los métodos de la presente invención puede ser cualquier célula eucariótica que pueda producir el virus de interés. La invención usará típicamente una línea celular aunque, por ejemplo, pueden usarse células primarias como una alternativa. La célula será típicamente de mamífero. Las células adecuadas de mamífero incluyen, aunque no se limitan a, células de hámster, ganado, primate (incluyendo humanos y monos) y de perro. Pueden usarse varios tipos celulares, como células de riñón, fibroblastos, células de retina, células de pulmones, etc. Los ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Las células adecuadas de monos son, por ejemplo, células de mono verde africano, como células de riñón como en la línea celular Vero [14-16]. Las células de perro adecuadas, por ejemplo, células de riñón, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

Más células adecuadas incluyen, aunque no se limitan a: CHO, 293T; BHK; MRC 5; PER.C6 [17]; FRhL2; WI-38; etc. Las células adecuadas están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la colección del cultivo americano de célula tipo (ATCC) [18], de los depósitos de células Coriell [19], o de la colección europea de cultivos celulares (ECACC). Por ejemplo, ATCC suministra varias células diferentes Vero bajo los números de catálogo CCL 81, CCL 81.2, CRL 1586 y CRL-1587 y suministra células MDCK bajo el número de catálogo CCL 34. PER.C6 está disponible del ECACC bajo el número de depósito 96022940.

Las células preferentes para su uso en la invención son células MDCK [20-22], derivadas de riñón canino Madin Darby. Las células MDCK originales están disponibles en ATCC como CCL 34. Es preferente que se usen los derivados de MDCK. Tales derivados se describieron, por ejemplo, en la referencia 20 que desvela células MDCK que se adaptaron para crecimiento en cultivo de suspensión ("MDCK 33016" o "33016-PF", depositadas como DSM ACC 2219; también véase la ref. 20). Además, la referencia 23 desvela células derivadas de MDCK que crecen en suspensión en cultivo libre de suero ("B-702", depositado como FERM BP-7449). En algunas realizaciones, la línea celular MDCK usada es tumorigénica. También se concibe usar células MDCK no tumorigénicas. Por ejemplo, la referencia 24 desvela células MDCK no tumorigénicas que incluyen "MDCK-S" (ATCC PTA-6500), MDCK-SF101" (ATCC PTA-6501), MDCK-SF102" (ATCC PTA-6502), MDCK-SF103" (ATCC PTA-6503), MDCK-S" (ATCC PTA-

6500). La referencia 25 desvela células MDCK con elevada susceptibilidad a la infección, incluyendo células "MDCK.5F1" (ATCC CRL 12042).

5 Es posible usar una mezcla de más de un tipo de célula para practicar los métodos de la presente invención. Sin embargo, es preferente que los métodos de la invención se practiquen con un único tipo de célula, por ejemplo, con células monoclonales. Preferentemente, las células usadas en los métodos de la presente invención son de una única línea celular. Además, la misma línea celular puede usarse para recombinar el virus y para la posterior propagación del virus.

10 Preferentemente, las células se cultivan en ausencia de suero, para evitar una fuente común de contaminantes. Una persona experta en la técnica conoce varios medios libres de suero para cultivo de células eucarióticas (por ejemplo, medio de Iscove, medio ultra CHO (BioWhittaker), EX – CELL (JRH Biosciences)). Además, pueden usarse medios libres de proteínas (por ejemplo, PF-CHO (JRH Biosciences)). De otra manera, las células para réplica pueden también cultivarse en el medio habitual que contiene suero (por ejemplo, medio MEM o DMEM con 0,5% a 10% de suero feta bovino).

15 Las células pueden estar en cultivo adherente o en suspensión.

20 **Recombinación convencional**

Tradicionalmente, los virus de gripe se recombinan co-infectando un huésped de cultivo, normalmente huevos, con una cepa donante y una cepa de vacuna. Los virus recombinantes se seleccionan añadiendo anticuerpos con especificidad para las proteínas HA y/o NA de la cepa donante con el fin de seleccionar los virus recombinantes que contengan las proteínas HA y/o NA de la cepa de vacuna. Durante los varios pasos de este tratamiento se pueden seleccionar virus recombinantes de rápido crecimiento que contengan los segmentos HA y/o NA de la cepa de vacuna.

25 La invención es adecuada para su uso en estos métodos. Puede ser más fácil usar las cepas de vacuna con un subtipo HA y/o NA diferente en comparación con las cepas donantes ya que esto facilita la selección de virus recombinantes. Sin embargo, es posible usar cepas de vacunas con el mismo subtipo HA y/o NA como las cepas donantes y en algunos aspectos de la invención es preferente. En este caso, los anticuerpos con especificidad preferencial para las proteínas HA y/o NA de las cepas donantes deberían estar disponibles.

35 **Preparación del virus**

En una realización, la invención proporciona un método para producir virus de gripe que comprende las etapas de (a) infectar un huésped de cultivo con un virus recombinante de la invención; (b) cultivar el huésped de la etapa (a) para producir el virus; y opcionalmente (c) purificar el virus obtenido en la etapa (b).

40 El huésped de cultivo puede ser células o huevos embrionados de gallina. Donde las células se usan como un huésped de cultivo en este aspecto de la invención, es conocido que las condiciones de cultivo celular (por ejemplo, temperatura, densidad celular, valor de pH, etc.) son variables durante un amplio rango sujeto a la línea celular y al virus empleado y pueden adaptarse a los requisitos de la solicitud. Por lo tanto, la siguiente información representa meramente reglas generales.

45 Como se ha mencionado anteriormente, las células se cultivan preferentemente en medio libre de suero y libre de proteína.

50 La multiplicación de las células puede realizarse de acuerdo con métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un sistema de perfusión usando métodos ordinarios de soporte como centrifugación o filtración. Además, las células pueden multiplicarse de acuerdo con la invención en un sistema de lotes de alimentación antes de la infección. En este contexto de la presente invención, un sistema de cultivo es referido como un sistema de lotes de alimentación donde las células inicialmente se cultivan en un sistema de lotes y disminución de nutrientes (o parte de los nutrientes) en el medio se compensa mediante alimentación controlada de nutrientes concentrados. Puede ser ventajoso ajustar el valor pH del medio durante la multiplicación de células antes de la infección a un valor entre pH 6.6 y pH 7.8 y especialmente entre pH 7.2 y pH 7.3. El cultivo de las células preferentemente ocurre a una temperatura entre 30 y 40°C. Cuando se cultivan las células infectadas (etapa ii), las células se cultivan preferentemente a una temperatura de entre 30°C y 36°C o entre 32°C y 34°C o a 33°C. Esto es particularmente preferente ya que se ha demostrado que la incubación de células infectadas en este rango de temperatura da como resultado una producción de virus que da como resultado una eficacia mejorada cuando se formulan en una vacuna [26].

60 La presión parcial de oxígeno puede ajustarse durante el cultivo antes de la infección preferentemente en un valor entre 25% y 95% y especialmente en un valor entre 35% y 60%. Los valores para la presión parcial de oxígeno en el contexto de la invención se basan en saturación de aire. La infección de células ocurre normalmente en una densidad celular de preferentemente aproximadamente $8\text{-}25 \times 10^5$ células/ml en el sistema de lote o

preferentemente aproximadamente $5\text{-}20 \times 10^6$ células/ml en el sistema de perfusión. Las células pueden infectarse con una dosis viral (valor MDI, "multiplicidad de infección"; corresponde al número de unidades de virus por célula en el momento de la infección) entre 10^{-8} y 10, preferentemente entre 0,0001 y 0,5.

5 Los virus pueden crecer en células en cultivo adherente o en suspensión. Pueden usarse cultivos microtransportadores. En algunas realizaciones, las células pueden así adaptarse para crecimiento en suspensión.

10 Los métodos de acuerdo con la invención también incluyen cosecha y aislamiento de virus o las proteínas generadas por ellos. Durante el aislamiento de virus o proteínas, las células se separan del medio de cultivo mediante métodos estándares como separación, filtración o ultrafiltración. Los virus o proteínas después se concentran de acuerdo con métodos suficientemente conocidos por aquellos expertos en la técnica, como centrifugación con gradiente, filtración, precipitación, cromatografía, etc., y después se purifican. También es preferente, de acuerdo con la invención, que los virus se inactiven durante o después de la purificación. La inactivación de virus puede ocurrir, por ejemplo, con β -propiolactona o formaldehído en cualquier punto durante el proceso de purificación.

15 El huésped de cultivo puede ser huevos. El método estándar actual para crecimiento de virus de gripe para vacunas usa huevos de gallina SPF embrionados, con virus estando purificado de los contenidos del huevo (fluido alantoideo). También es posible pasar un virus a través de huevos y posteriormente propagarlo en un cultivo celular y viceversa.

Vacuna

20 La invención utiliza virus producidos de acuerdo con el método para producir vacunas.

25 Las vacunas (particularmente para virus de gripe) se basan generalmente en virus vivos o virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones enteros, viriones "partidos" o en antígenos de superficie purificada. Los antígenos también pueden estar presentes en forma de virosomas. La invención puede usarse para fabricar cualquiera de estos tipos de vacunas.

30 Donde se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender virión entero, virión partido o antígenos de superficie purificada (para gripe, incluyendo hemaglutinina y, normalmente, también incluyendo neuraminidasa). Los medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad efectiva de uno más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β -propiolactona, azul metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60), etilamina binaria, acetil etileneimina o combinaciones de los mismos. Los métodos de inactivación viral son conocidos en la técnica, como por ejemplo luz UV o irradiación gamma.

35 Los viriones pueden cosecharse de fluidos que contienen virus, por ejemplo, fluido alantoideo o sobrenadante de cultivo celular mediante varios métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede incluir centrifugación zonal usando una solución gradiente de sacarosa lineal que incluye detergente para interrumpir los viriones. Los antígenos pueden después purificarse, después de dilución opcional, mediante diafiltración.

40 Los viriones partidos se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, deoxicolato, tri-N-butil fosfato, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subvirión, incluyendo el proceso de partición "Tween-eter". Los métodos para partir virus de gripe, por ejemplo son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, referencias 27-32, etc. La partición de los virus se realiza típicamente interrumpiendo o fragmentando el virus entero, sea infeccioso o no infeccioso con una concentración interruptora de agente de partición. La interrupción da como resultado una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Los agentes de partición preferentes son surfactantes no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, azúcares de acilo, sulfobetainas, betainas, polioxietilenoalquileteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, NP9, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTABs (bromuros de cetil trimetil amonio), tri-N-butil fosfato, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los polioxietanoles de octil- o nonilfeonxi (por ejemplo, los surfactantes Triton, como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de sorbitán de polioxietileno (los surfactantes Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento útil de partición usa los efectos consecutivos de doxicolato de sodio y formaldehído, y la partición puede tener lugar durante la purificación inicial del virión (por ejemplo, en una solución gradiente con densidad de sacarosa). Así, el proceso de partición puede incluir la clarificación del material que contiene el virión (para retirar el material no virión), la concentración de los viriones cosechados (por ejemplo, usando un método de adsorción, como adsorción con CaHPO_4), separación de viriones enteros de material no virión, partición de viriones usando un agente de partición en una etapa de centrifugación con gradiente de densidad (por ejemplo, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de partición como doxicolato de sodio), y después filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para retirar los materiales no deseado. Los viriones partidos pueden volverse a suspender útilmente en una solución de cloruro de sodio isotónica amortiguada con fosfato de sodio. Ejemplos de vacunas de gripe partidas son productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™.

Las vacunas de antígeno de superficie de virus de gripe purificada comprende hemaglutinina de antígenos de superficie y, típicamente, también neuraminidasa. Los procesos para preparar estas proteínas en forma purificada son bien conocidas en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPAL™ e INFLUVAC™ son vacunas de subunidad de gripe.

Otra forma de antígeno inactivado es el virosoma [33] (partículas de liposoma de tipo viral libres de ácido nucleico). Los virosomas pueden prepararse mediante solubilización de virus con un detergente seguido de retirada del nucleocápsido y reconstitución de la membrana que contiene las glicoproteínas virales. Un método alternativo para preparar virosomas incluye la adición de glicoproteínas de membrana viral para exceder cantidades de fosfolípidos, para dar liposomas con proteínas virales en su membrana.

Los métodos de la invención también pueden usarse para producir vacunas vivas. Tales vacunas normalmente se preparan purificando viriones de fluidos que contienen viriones. Por ejemplo, los fluidos pueden clarificarse mediante centrifugación y estabilizarse con amortiguador (por ejemplo, que contenga sacarosa, fosfato de potasio y glutamato monosodio). Actualmente hay disponibles varias formas de vacuna de virus de gripe (por ejemplo, véase capítulos 17 y 18 de referencia 34). Las vacunas de virus vivo incluyen el producto FLUMIST™ de MedImmune.

El virus puede atenuarse. El virus puede ser sensible a la temperatura. El virus puede adaptarse al frío. Estas tres características son particularmente útiles cuando se usa virus vivo como un antígeno.

HA es el principal inmunogen en vacunas de gripe inactivadas actuales, y las dosis de vacuna se estandarizan por referencia a niveles HA, típicamente medidos por SRID. Las vacunas existentes contienen típicamente aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden usarse dosis más bajas para niños, o en situación pandémicas, o cuando se usa un adyuvante. Las dosis fraccionales tales como ½ (esto es, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y 1/8 se han usado, ya que tienen dosis más altas (por ejemplo 3x o 9x dosis [35,36]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc., por cepa.

Para vacunas vivas, la dosis se mide por la dosis infecciosa de cultivo en tejido media (DICT₅₀) en lugar del contenido de HA, y una DICT₅₀ de entre 10⁶ y 10⁸ (preferentemente entre 10^{6,5}-10^{7,5}) por cepa es típica.

Las cepas de gripe usadas con la invención pueden tener un HA natural como se encuentra en un virus de tipo salvaje, o un HA modificado. Por ejemplo, es conocido modificar HA para retirar determinantes (por ejemplo, regiones hiperbásicas alrededor del sitio de división HA1/HA2) que provoca que un virus sea altamente patogénico en una especie aviar. El uso de genética inversa facilita tal modificación.

También siendo adecuadas para inmunizar contra cepas inter-pandémicas, las composiciones de la invención son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas o potencialmente pandémica. La invención es adecuada para vacunar humanos así como animales no humanos.

Otras cepas cuyos antígenos pueden incluirse útilmente en las composiciones son cepas que son resistentes a terapia antiviral (por ejemplo, resistentes a oseltamivir [37] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [38].

Las composiciones de la invención pueden incluir antígenos de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) cepas de virus de gripe, incluyendo virus de gripe A y/o virus de gripe B siempre y cuando una cepa de gripe sea una cepa de gripe recombinante de la invención. Las composiciones donde al menos dos, al menos tres o todos los antígenos son de cepas de gripe recombinantes de la invención también se concibe. Donde una vacuna incluye más de una cepa de gripe, las diferentes cepas crecen típicamente por separado y se mezclan después de que el virus se haya cosechado y los antígenos se hayan preparado. Así, un proceso de la invención incluye típicamente la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de gripe. Una vacuna trivalente es típica, incluyendo antígenos de dos cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B. una vacuna tetravalente es también útil [39], incluyendo antígenos de dos cepas de virus de gripe A y dos cepa de virus de gripe B, o tres cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de vacuna fabricadas de acuerdo con la invención son farmacéuticamente aceptables. Normalmente incluyen componentes además de antígenos, por ejemplo, típicamente incluyen uno o más transportadores farmacéuticos y/o excipientes. Como se describe más abajo, también pueden incluirse adyuvantes. Una exposición exhaustiva de tales componentes está disponible en la referencia 40.

Las composiciones de vacuna estarán generalmente en forma acuosa. Sin embargo, algunas vacunas pueden estar en forma seca, por ejemplo, en forma de sólidos inyectables o preparaciones secadas o polimerizadas en un parche.

5 Las composiciones de vacuna pueden incluir conservantes como tiomersal o 2-fenoxietaqonl. Sin embargo, es preferente que la vacuna esté libre sustancialmente de (esto es, menos de 5 µg/ml) material de mercurio, por ejemplo, libre de tiomersal [31, 41]. Las vacunas que no contienen mercurio son preferentes. Un succinato de α-tocoferol puede incluirse como una alternativa a compuestos de mercurio [31]. Las vacunas libres de conservantes son particularmente preferente.

10 Para controlar la tonicidad, es preferente incluir una sal fisiológica, como una sal de sodio. El cloruro de sodio (NaCl) es preferente, que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, fosfato dihidrógeno de potasio, dehidrato de fosfato disodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

15 Las composiciones de vacuna generalmente tendrán una osmolaridad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferentemente estarán en el rango de 290-310 mOsm/kg. Se ha presentado previamente que la osmolaridad no tiene impacto en el dolor causado por la vacunación [42], pero mantener la osmolaridad en este rango es sin embargo preferente.

20 Las composiciones de vacuna pueden incluir uno o más amortiguadores. Los amortiguadores típicos incluyen: un amortiguador de fosfato, un amortiguador Tris, un amortiguador de borato, un amortiguador de succinato, un amortiguador de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio) o un amortiguador de citrato. Los amortiguadores se incluirán típicamente en el rango de 5-20mM.

25 El pH de una composición de vacuna estará generalmente entre 5,0 y 8,1 y más típicamente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo 6,5 o 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Por lo tanto, un proceso para la invención puede incluir una etapa de ajuste de pH de la vacuna al por mayor antes del empaquetado.

30 La composición de vacuna es preferentemente estéril. La composición de vacuna es preferentemente no pirogénica, por ejemplo, contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición de vacuna está preferentemente libre de gluten.

35 Las composiciones de vacuna de la invención pueden incluir detergente, por ejemplo, un surfactante de éster sorbitán de polioxietileno (conocido como "Tweens"), un octoxinol (como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetil trimetil amonio ("CTAB") o deoxicolato de sodio, particularmente para una vacuna partida o de antígeno de superficie. El detergente puede estar presente solamente en cantidades de trazas. Así, la vacuna puede incluir menos de 1mg/ml de cada octoxinol-10 y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades de traza podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

40 Una composición de vacuna puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (esto es, un kit "multidosis"). La inclusión de un conservante es preferente en disposiciones de multidosis. Como alternativa (o en adición) a incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la retirada del materia.

45 Las vacunas de gripe se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse media dosis (esto es, aproximadamente 2,5ml) a niños.

50 Las composiciones y kits se almacenan preferentemente entre 2°C y 8°C. No deberían congelarse. Deberían mantenerse idealmente fuera de la luz directa.

ADN de célula huésped

55 Donde los virus se han aislado y/o crecido en una línea celular, es una práctica estándar minimizar la cantidad de ADN de línea celular residual en la vacuna final, con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica potencial del ADN:

60 Así, una composición de vacuna preparada de acuerdo con la invención contiene preferentemente menos de 10ng (preferentemente menos de 1ng, y más preferentemente menos de 100pg) de ADN de célula huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades de traza de ADN de célula huésped.

65 Es preferente que la longitud media de cualquier ADN de célula huésped residual sea inferior a 500bp, por ejemplo, menos de 400bp, menos de 300bp, menos de 200bp, menos de 100bp, etc.

El ADN contaminante puede retirarse durante la preparación de vacuna usando procedimientos estándares de purificación, por ejemplo, cromatografía, etc. La retirada de ADN de célula huésped residual puede mejorarse mediante tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando ADNasa. Un método conveniente para reducir contaminación de ADN de célula huésped se desvela en las referencias 432 y 44, que incluye un tratamiento de dos etapas, primero usando ADNasa (por ejemplo, Benzonasa), que puede usarse durante crecimiento viral, y después un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede usarse durante interrupción de virión. El tratamiento con un agente alquilante, como β -propiolactina, también puede usarse para retirar el ADN de célula huésped, y ventajosamente puede también usarse para inactivar viriones [45]

10 **Adyuvantes**

Las composiciones de la invención pueden incluir ventajosamente un adyuvante, que puede funcionar para mejorar las respuestas inmunes (humorales y/o celulares) obtenidas en un sujeto que recibe la composición. Los adyuvantes preferentes comprenden emulsiones de aceite en agua. Varios adyuvantes son conocidos, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un surfactante, siendo el aceite (o aceites) y surfactante (o surfactantes) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente menos de 5 μ m en diámetro, e idealmente tienen un diámetro de sub-micrón, consiguiéndose estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotitas con un tamaño inferior a 220nm son preferentes ya que pueden someterse a esterilización con filtro.

La emulsión puede comprender aceites como aquellos de origen animal (como pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. Aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de cojo y aceite de oliva, los más disponibles comúnmente, ejemplifican los aceites de frutos secos. El aceite de jojoba puede usarse, por ejemplo, obtenido de la alubia de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de alazor, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de cereales, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero el aceite de otros granos de cereales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares también pueden usarse. Los ésteres de ácido graso 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, mientras no ocurran de manera natural en aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados que parten de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto puede usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos para separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescados que pueden usarse aquí. Un número de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y son generalmente referidos como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene terpenoides ramificados no saturados conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que aquí es particularmente referido. El escualano, el análogo saturado para escualeno, es también un aceite preferente. Los aceites de pescados, incluyendo escualeno y es escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Otro aceite preferente es un α -tocoferol (véase más abajo).

Pueden usarse mezclas de aceites.

Los surfactantes pueden clasificarse por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los surfactantes preferentes de la invención tienen un EHL de al menos 10, preferentemente al menos 15 y más preferentemente al menos 16. La invención también puede usarse con surfactantes que incluyen, aunque no se limitan a: surfactantes de éster de sorbitán de polioxietileno (comúnmente referidos como Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y /o óxido de butileno (OB), vendido bajo el nombre comercial DOWFAX™, como polímeros de bloque OE/OP; oxtoxinolos, que pueden variar en el número de repeticiones de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodil), con oxtoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos como una fosfatidilcolina (lecitina); nonilfenol etoxilatos, como Tergitol™ serie NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como surfactantes Brij), como éter de trietilenoglicol monolaurilo (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPANs), como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los surfactantes no iónicos son preferentes. Los surfactantes preferentes para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de sorbitán de polioxietileno), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de surfactantes, por ejemplo, mezclas Tween 80/Span 85. Una combinación de éster de sorbitán de polioxietileno como monooleato de sorbitán de polioxietileno (Tween 80) y un octoxinal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) es también adecuada. Otra combinación útil comprende laurith 9 más un éster de sorbitán de polioxietileno 7/O un octoxinol.

Las cantidades preferentes de surfactantes (% por peso) son: ésteres de sorbitán de polioxietileno (como Tween 80) 0,01 a 1% en particular aproximadamente 0,1%; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (como Triton X-100, u

otros detergentes en la serie Triton) 0,001 a 0,1%, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (como laureth 9) 0,1 a 20%, preferentemente 0,1 a 10% y en particular 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

5 Donde la vacuna contiene un virus partido, es preferente que contenga surfactantes libres en la fase acuosa. Esto es ventajoso ya que el surfactante libre puede ejercer un "efecto de división" en el antígeno, por lo que interrumpe cualquier virión no partido y/o agregados de viriones que pueden estar presentes de otra manera. Esto puede mejorar la seguridad de vacunas con virus partido [46].

10 Las emulsiones preferentes tiene un tamaño medio de gotitas de <1µm, por ejemplo, ≤750nm, ≤500nm, ≤400nm, ≤750nm, ≤300nm, ≤250nm, ≤220nm, ≤200nm o más pequeño. Estos tamaños de gotitas se consiguen convenientemente mediante técnicas tales como microfluidización.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua útiles con la invención incluyen, aunque no se limitan a:

- 15 - Una emulsión submicrón de escualeno, Tween 80 y Span 85. Las composición de la emulsión por volumen puede ser aproximadamente 5% escualeno, 0,5% polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% Span 85. En términos de peso, estas proporciones se vuelven 4,3% escualeno, 0,5% polisorbato 80 y 0,48% Span 85. Este adyuvante es conocido como "MF59" [47-49], como se describe con más detalle en el Capítulo 10 de ref. 50 y capítulo 12 de ref. 51. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones de citrato, por ejemplo, 20 10mM de tampón de citrato de sodio.
- 25 - Una emulsión que comprende escualeno, un tocoferol y polisorbato 80. La emulsión puede incluir salina amortiguada con fosfato. Estas emulsiones pueden tener por volumen desde 2 a 10% escualeno, desde 2 a 10% tocoferol y desde 0,3 a 3% polisorbato 80 y la proporción de peso de escualeno:tocoferol es preferentemente <1 (por ejemplo, 0,90) ya que esto puede proporcionar una emulsión más estable. El escualeno y polisorbato 80 pueden presentar una proporción de volumen de aproximadamente 5:2 o una proporción de peso de aproximadamente 11:5. Así, los tres componentes (escualeno, tocoferol, polisorbato 80) pueden estar presente en una proporción de peso de 1068:1186:485 o alrededor de 55:61:25. Tal emulsión ("AS03") puede hacerse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución 2%, después 30 mezclando 90ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL α tocoferol y 5ml escualeno), después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite de submicrón, por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 y 250nm, preferentemente aproximadamente 180nm. La emulsión también puede incluir un lípido 3-de-O-monosofosforil acilado (3d MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, para dosis humana, 0,5-10 mg escualeno, 0,5-11 mg tocoferol y 0,1-4 mg polisorbato 80 [52], por ejemplo en las proporciones que se han señalado anteriormente.
- 35 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también incluye un 3d-MPL (véase más arriba). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
- 40 - Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un α-tocoferol succinato). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750µg/ml polisorbato 80, 110µg/ml Triton X-100 y 100µg/ml α-tocoferol succinato), y estas concentraciones deberían incluir cualquiera contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más arriba). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
- 45 - Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxamaro 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en salina amortiguada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de entrega útil para muramil dipéptidos, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [53] (0,05-1% Thr-MDP, 5% escualano, 2,5% Pluronic L121 y 0,2% polisorbato 80). Puede también usarse sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [54] (5% escualano, 1,25 Pluronic L121 y 0,2% polisorbato 80). La microfluidización es preferente.
- 50 - Una emulsión que comprende escualano, un disolvente acuoso, un surfactante no iónico hidrofílico de polioxietileno alquil éter (por ejemplo, polioxietileno (12) cetostearil éter) y un surfactante no iónico hidrofóbico (por ejemplo, un éter de sorbitán o éster de mannide, como monoleato de sorbitán o "Span 802). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos 90% de gotitas de aceite (por volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [55]. La emulsión puede también incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, como dodecilmaltoside y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista TLR4 [56]. Tales emulsiones puede liofilizarse.
- 55 - Una emulsión de escualeno, poloxamero 105 y Abil-Care [57]. La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas de adyuvantes son 5% escualeno, 4% poloxamero 105 (poliol plurónico) y 2% Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; caprílico/triglicérido caprico).
- 60 - Una emulsión que tienen de 0,5-50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípido y 0,05-5% de un surfactante no iónico. Como se describe en la referencia 58, los componentes fosfolípidos preferentes son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfático, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de las gotas de submicrón son ventajosos.
- 65 - Una emulsión agua en aceite de submicrón de un aceite no metabolizable (como aceite mineral ligero) y al menos un surfactante (como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos, como saponina QuilA, colesterol, un conjugado saponina-lipofilo (como GPI-0100, descrito en al referencia 59, producido

por la adición de amina alifática a desacilsaponina por medio del grupo carboxilo de ácido glucurónico), dimetiodioctadecilamonio bromuro y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- Una emulsión donde una saponina (por ejemplo QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [60].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipofílico no iónico y un surfactante hidrofílico no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o polímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno) [61].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrofílico no iónico y un surfactante lipofílico no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o polímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno) [61].

En algunas realizaciones, una emulsión puede mezclarse con antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración, y así el adyuvante y antígeno pueden mantenerse por separado en una vacuna empaquetada o distribuida, lista para la formulación final en el momento de uso. En otras realizaciones una emulsión se mezcla con antígeno durante la fabricación, y así la composición se empaqueta en una forma de adyuvante líquido. El antígeno estará generalmente en forma acuosa, de tal manera que la vacuna se prepare finalmente mezclando dos líquidos. La proporción de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero es generalmente aproximadamente 1:1. Donde las concentraciones de los componentes se dan en las descripciones anteriores de emulsiones específicas, estas concentraciones son típicamente para una composición no diluida, y la concentración después de mezclar con una solución de antígeno así disminuirá.

Empaquetado de composiciones de vacuna

Los recipientes adecuados para las composiciones de la invención (o componentes del kit) incluyen viales, jeringas (por ejemplo, jeringas desechables), pulverizadores nasales, etc. Estos recipientes deberían ser estériles.

Donde una composición/componente se localiza en un vial, es vial está hecho preferentemente de cristal o material de plástico. El vial se esteriliza preferentemente antes de que se añada la composición. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferentemente con un tapón libre de látex, y la ausencia de látex en todo el material de empaquetado es preferente. El vial puede incluir una dosis única de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ejemplo, 10 dosis. Los viales preferentes están hecho de cristal incoloro.

Un vial puede tener un tapón (por ejemplo, un cierre Luer) adaptado de tal manera que la jeringa prellenada se pueda insertar en el tapón, los contenidos de la jeringa pueden expulsarse en el vial (por ejemplo, para reconstituir material liofilizado en él), y los contenidos del vial puedan retirarse de vuelta a la jeringa. Después de la retirada de la jeringa del vial, una aguja puede unirse después y la composición puede administrarse a un paciente. El tapón está preferentemente situado dentro de un sello o cubierta, de tal manera que el sello o cubierta puedan retirarse antes de que pueda accederse al tapón. Un vial puede tener un tapón que permita la retirada aséptica de sus contenidos, particularmente para viales multidosis.

Donde un componente se empaqueta en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a la misma. Si no se une una aguja, puede suministrarse a la jeringa una aguja separada para montaje y uso. Tal jeringa puede tener funda. Las agujas de seguridad son preferentes. Las agujas de 1-pulgada 23-gauge, 1-pulgada 25-gauge y 5/8 pulgadas 25-gauge son preferente. Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas que se despegan donde pueden estar impresos el número de lote, la estación de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo en la jeringa tiene preferentemente un tapón para prevenir que el émbolo se retire por accidente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un tapón de goma de látex y/o émbolo. Las jeringas desechables contienen una única dosis de vacuna. La jeringa tendrá generalmente una un tapón en la punta para sellar la punta antes de la unión a la jeringa, y el tapón de la punta está hecho preferentemente de goma de butilo. Si la jeringa y la aguja se empaquetan por separado, entonces la aguja está preferentemente adaptada con un escudo de goma de butilo. Las jeringas preferentes son aquellas comercializadas bajo el nombre comercial "Tip-Lok"™.

Los recipientes pueden marcarse para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar su administración a niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.

Donde se usa un recipiente de cristal (por ejemplo, una jeringa o un vial), entonces es preferente usar un recipiente hecho de un cristal de borosilicato en lugar de un cristal cal-soda.

Un kit o composición puede empaquetarse (por ejemplo en la misma caja) con un folleto que incluya detalles de la vacuna, por ejemplo, instrucciones para administración, detalles de los antígenos en las vacunas, etc. Las instrucciones pueden también contener advertencias, por ejemplo, para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica después de la vacunación, etc.

Métodos de tratamiento y administración de la vacuna

La invención proporciona una vacuna fabricada de acuerdo con la invención. Estas composiciones de vacuna son adecuadas para su administración a sujetos animales humanos y no humanos, como cerdos o aves, y la invención proporciona un método para provocar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende la etapa de administración de una composición de la invención al sujeto. La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento, y proporciona el uso de una composición de la invención para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un sujeto.

La respuesta inmune provocada por estos métodos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpo protector. Los métodos para evaluar las respuestas inmunes, neutralizar la capacidad y protección después de la vacuna del virus de gripe son bien conocidos en la técnica. Los estudios humanos han mostrado que los títulos de anticuerpo contra hemaglutinina de virus de gripe humana y correlacionados con protección (un título de inhibición de hemaglutinación de muestra de suero de aproximadamente 30-40 da alrededor de 50% de protección de infección por un virus homólogo) [62]. Las respuestas de anticuerpo se miden por inhibición de hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (IRS) y/o por hemólisis radial simple (HRS). Estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

Las composiciones de la invención pueden administrarse de varias maneras. La ruta de administración más preferente es mediante inyección intramuscular (Por ejemplo, en el brazo o pierna), pero otras rutas disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [63-65], oral [66], intradérmica [67,68], transcutánea, transdérmica [69], etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Las vacunas se recomiendan actualmente para uso en inmunización pediátrica y adulta, desde la edad de 6 meses. Así, un sujeto humano puede tener menos de 1 año, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años. Los sujetos preferentes para recibir las vacunas son las personas mayores (por ejemplo, ≥ 50 años, ≥ 60 años y preferentemente ≥ 65 años), los niños (por ejemplo, ≥ 5 años), sujetos hospitalizados, trabajadores en sanidad, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, sujetos inmunodeficientes, sujetos que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; véase más abajo) en los 7 días antes de recibir la vacuna, personas con alergia al huevo y personas que viajen al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son solamente adecuadas para estos grupos, y pueden usarse más generalmente en una población. Para cepas pandémicas, es preferente la administración a todos los grupos de edad.

Las composiciones preferentes de la invención satisfacen 1, 2 o 3 de los criterios CPMP para eficacia. En adultos (18-60 años), estos criterios son: (1) $\geq 70\%$ seroprotección; (2) $\geq 40\%$ seroconversión; y/o (3) un aumento GMT de $\geq 2,5$ -veces. En personas mayores (>60 años), estos criterios son: (1) $\geq 60\%$ seroprotección; (2) $\geq 30\%$ seroconversión; y/o (3) un aumento GMT de ≥ 2 -veces. Estos criterios se basan en estudios de etiqueta abierta con al menos 50 pacientes.

El tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de recuerdo. En un programa de múltiples dosis las varias dosis pueden darse mediante la misma ruta o diferentes rutas, por ejemplo, principal parenteral y refuerzo mucosa, principal mucosal y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en pacientes que inmunológicamente no se han sometido a tratamiento, por ejemplo, pacientes que nunca han recibido antes una vacuna de gripe, o para vacunar contra un nuevo subtipo HA (como en un brote pandémico). Las dosis múltiples se administrarán típicamente al menos con una semana de separación (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Las vacunas producidas por la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o centro de vacunación) otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que la vacuna del sarampión, vacuna de paperas, vacuna de rubeola, vacuna MMR, vacuna de varicela, vacuna de MMRV, vacuna de difteria, vacuna de tétanos, vacuna de tos ferina, vacuna DTP, una vacuna conjugada de *H. influenzae* tipo b, una vacuna de polivirus desactivado, una vacuna de virus de hepatitis B, una vacuna de conjugado de meningococo (como vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna de virus sincitial respiratorio, una vacuna de conjugado neumococo, etc. La administración sustancialmente al mismo tiempo de una vacuna de neumococo y/o una vacuna de meningococo es particularmente útil en paciente mayores.

Similarmente, las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes al mismo tiempo que (durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o centro de vacunación) un compuesto antiviral, y en particular un compuesto antiviral activo contra virus de gripe (por ejemplo, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de neuraminidasa, como (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-ácido carboxílico o 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-D-glicero-D-

galactonon-2-ácido enónico, incluyendo ésteres de los mismos (por ejemplo, ésteres de etilo) y sales de los mismos (por ejemplo, sales de fosfato). Un antiviral preferente es (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-ácido carboxílico, éster de etilo, fosfato (1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

5 **General**

10 El término “comprendiendo” engloba “incluyendo” así como “consistiendo”, por ejemplo, una composición comprendiendo X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X+Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que es “sustancialmente libre” de XY puede estar completamente libre de Y. Donde es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

15 El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

20 A menos que se establezca lo contrario, un proceso que comprende la etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Así, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Donde hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y después la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

25 Las varias etapas de los métodos pueden realizarse al mismo tiempo o en diferentes momentos, en la misma o diferente localización geográfica, por ejemplo, países, y por el mismo o diferentes personas o entidades.

30 Donde se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberían obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EETs) en particular libre de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En general, es preferente cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Donde un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede sustituirse alternativamente por un profármaco adecuado.

35 Las referencias a una identidad secuencial porcentual entre dos secuencias de aminoácido significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo comparando las dos secuencias. Este alineamiento y la homología porcentual pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 70. Un alineamiento preferente es el determinado por el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman que usa una búsqueda de hueco afín con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se muestra en la referencia 71.

40 Las referencias a una identidad secuencial porcentual entre dos secuencias de ácido nucleico significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases es el mismo comparando las dos secuencias. Este alineamiento y la homología porcentual pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 70. Un programa de alineamiento preferente es GCG Gap (Genetics Computer Group, Wisconsin, Suite Versión 10.1), que preferentemente usa parámetros estándares, que son los siguientes: hueco de apertura = 34; hueco de extensión = 1.

50 **Breve descripción de los dibujos**

55 La Figura 1 ilustra varios títulos (por ensayo de formación de foco (FFA); Figura 1A) Títulos HA (por ensayo de hemaglutinación de glóbulo rojo; Figura 1B) en tiempos diferentes de post-infección de virus wt PR8 y PR8-X que crecieron en células MDCK. La línea continua en la Figura 1A y las columnas sombreadas en la Figura 1B representan resultados con PR8 de tipo salvaje. La línea de puntos en la Figura 1A y las columnas vacías en la Figura 1B representan resultados de PR8-X de tipo salvaje. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y en las figura 1A y 1B muestra el título del virus (UI/ml) y título HA, respectivamente.

60 La Figura 2 ilustra títulos de virus (por FFA; Figura 2A) y títulos HA (por ensayo de hemaglutinación de glóbulo rojo; Figura 2B) en diferentes tiempos después de la infección de genética inversa derivó virus PR8 y PR8-X que crecieron en células MDCK. La línea continua en la Figura 2A y las columnas sombreadas en la Figura 2B representan resultados con PR8. Las línea de puntos en la Figura 2A y las columnas vacías en la Figura 2B representan resultados con PR8-X derivado de RG. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y en las figuras 2A y 2B muestra los títulos del virus (UI/ml) y título HA, respectivamente.

65 La Figura 3 copara títulos de virus (por FFA; Figura 3A) y títulos HA (por ensayo de hemaglutinación de glóbulo rojo; Figura 2B) en diferentes tiempos después de la infección en células MDCK de virus recombinantes 6:2

derivados de genética inversa hechos con segmentos del eje principal de PR8 o PR8-X que contienen los segmentos HA y NA con el eje principal de PR8. La línea de puntos en la Figura 3^a y las columnas vacías en la Figura 3B representan resultados con el eje principal de PR8-X. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y en las figuras 3A y 3B muestra el título de virus (UI/ml) y título HA, respectivamente.

5 La Figura 4 compara títulos de virus por FFA (Figura 4A) y títulos HA (por ensayo de hemaglutinación de glóbulo rojo; Figura 4B) en diferentes tiempos después de la infección en células MDCK de virus recombinantes 6:2 derivados de genética inversa hechos con segmentos del eje principal de PR8 o PR8-X que contienen los segmentos HA y NA de 105p30. La línea continua en la Figura 5^a y las columnas sombreadas en la Figura 5B representan resultados con el eje principal de wt PR8. La línea de puntos en la Figura 5^a y las columnas vacías en la Figura 5B representan resultados con el eje principal de PR8-X. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y en las figuras 3A y 3B muestra el título de virus (UI/ml).

10 La Figura 6 ilustra títulos de virus por ensayo de formación de foco (FFA) en tiempos diferentes de post-infección de virus PR8-X de tipo salvaje y 105p30 (Figura 6A) o virus PR8-X y 105p30 derivados de genética inversa (Figura 6B) que crecieron en células MDCK. En las figuras 6A y 6B, las líneas continuas representan resultados con 105p30. Las líneas de puntos representan resultados con PR8-X. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y en las figura 6A y 6B muestra el título del virus (UI/ml) y título HA, respectivamente.

15 La Figura 7 muestra las características de crecimiento de virus recombinantes que contienen los segmentos del eje principal de la cepa wt Pr8 (línea con triángulos) o cepa 105p30 (línea con cuadrados) y los segmentos HA y NA de una cepa pandémica de gripe H1 (cepa 2). El eje x en las figura 7A y 7B indica las horas después de la infección. El eje y en la Figura 7A muestra el título Log₁₀ en FFU por ml. El eje y en la Figura 7B muestra el título log₁₀ en partículas de virus por mL.

20 La Figura 8 compara títulos de virus por ensayo de formación de foco (FFA) en tiempos diferentes de post-infección en células MDCK de virus recombinantes 6:2 derivados de genética inversa hechos con segmentos del eje principal de 105p30 o PR8-X que contienen los segmentos HA y NA de (A) una cepa H1 (cepa 1) o (B) una cepa pandémica de H1 (cepa 2). Las líneas continuas representan los resultados con el eje principal de 105p30. Las líneas de puntos representan los resultados con el eje principal de PR8-X. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y muestra el título de virus (UI/ml).

25 La Figura 9 compara títulos de virus mediante ensayo de formación de foco (FFA) en tiempos diferentes de post-infección en células MDCK de virus recombinantes 6:2 derivados de genética inversa hechos con el segmento principal de #17, #19 o PR8-X en combinación con los segmentos HA y NA de (A) cepa pandémica de H1 (cepa 3) o (B) un H3 (cepa 1). Las líneas continuas con marcadores de diamante representan resultados con el eje principal #19. Las líneas de puntos con marcadores cuadrados representan resultados con el eje principal de PR8-X. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y muestra el título de virus (UI/ml).

30 La Figura 10 compara títulos de virus mediante ensayo de formación de foco (FFA) en tiempos diferentes de post-infección en células MDCK de virus recombinantes 6:2 derivados de genética inversa hechos con el quimérico #19 o segmento principal de PR8-X más los segmentos HA y NA de las siguientes cepas: (A) una cepa pandémica H1 (cepa 2), (B) una cepa pandémica H1 (cepa 4), (C) una cepa H1 (cepa 3) o (E) una cepa H3 (cepa 2). En las Figuras 10A-E, las líneas continuas con los marcadores de triángulo representan resultados con el eje central #19. Las líneas de puntos con marcadores cuadrados representan resultados con el segmento principal de PR8-X. El eje x muestra las horas después de la infección y el eje y muestra el título de virus (UI/ml).

35 La Figura 11 compara las producciones HA (por ELISA de captura de lectina) y 60 horas post-infección en células MDCK de diferentes virus recombinantes 6:2 con quimérico #19 (columnas vacías) o segmento principal de PR8-X (columnas continuas) más los segmentos HA y NA de las siguientes cepas: (A) una cepa pandémica H1 (cepa 2), (B) una cepa pandémica H1 (cepa 4), (C) una cepa H3 (cepa 1) y (D) una cepa H3 (cepa 2). Los virus correspondientes recombinantes 6:2 hechos mediante recombinación clásica ("clásicos") con el segmento principal de wt PR8 se incluyeron como controles (columnas sombreadas). El eje y muestra el contenido HA en µg por mL.

40 La Figura 12 muestra las curvas de crecimiento de virus recombinantes de gripe que comprenden segmentos principales 17, 18, 19 y 20 (mostrados en la tabla 1; línea con diamantes, cuadrados, triángulos y cruces, respectivamente), un control que comprende los mismos segmentos HA y NA de una cepa de gripe H3 (cepa 1) pero todos los segmentos del eje principal de PR8-X (línea con círculos) y la cepa de tipo salvaje equivalente (línea con el signo más). El eje x indica las horas post-infección (hpi) y el eje y muestra UI/ml.

45 La Figura 13 muestra la curva de crecimiento de virus recombinantes de gripe que comprenden los segmentos principales 17, y 18 (línea con diamantes y triángulos, respectivamente) y los segmentos HA de una cepa H3 de gripe (cepa 3), un control que comprende los mismos segmentos HA y NA pero todos los segmentos del eje principal de PR8-X (línea con el signo más) la cepa de tipo salvaje equivalente (línea con círculos).

La Figura 14 muestra los resultados de FFA (14(A) y 14 (C)) y HA-ELISA (14(B) y ensayo 14 (D)) usando virus recombinantes de gripe que comprenden segmento principal 19 (caja abierta). El eje principal de PR8-X (caja sombreada) y el virus de gripe de tipo salvaje (caja con puntos). Las Figuras 14(A) y 14(B) muestran los resultados con una cepa de gripe H1 (cepa 2) y las figuras 14(C) y (D) muestran los resultados con una cepa de virus de gripe H3. El eje y en las figuras 14(A) y (C) indica el título de virus en UI/mL y el eje y en las figuras 14(B) y 14(D) indica HA en µg/mL.

La Figura 15 es un alineamiento del segmento viral M1 de A/New Caledonia/20/99 (SEQ ID NO. 33) y 105p30 (SEQ ID NO: 45).

Modos para realizar la invención

Desarrollo de nuevas cepas donantes

Con el fin de proporcionar cepas donantes de alto crecimiento, la cepa donante A/Puerto Rico/8/34 pasa en las células MDCK 33016 cinco veces. Usando este método, los inventores fueron capaces de obtener la cepa PR8-X que muestra características mejoradas de crecimiento en comparación con la cepa original.

La cepa donante de gripe 105p30 se proporcionó aislando un virus de gripe A/New Caledonia/20/199 de un aislado clínico en células MDCK 33016 y pasando el virus 30 veces. La cepa resultante tiene un segmento M con lisina en la posición correspondiente al aminoácido 95 en la SEQ ID NO: 33 cuando se alinea con SEQ ID NO: 33.

Características de crecimiento de virus wt PR8 y PR8-X

Con el fin de comparar las características de crecimiento de cepas donantes PR8-X y wt PR8, el título viral de estas cepas de virus se mide en células MDCK mediante ensayos de formación de foco y ensayos de hemaglutinina.

Ensayos de formación de foco (FFA)

Para FFA, células MDCK no infectadas se colocaron en placas en una densidad de $1,8 \times 10^4$ células/pocillo en 96 placas con pocillo en 100 µl de DMEM con 10% SFB. Al siguiente día, el medio se aspiró y las células se infectan con virus en un volumen de 50 µl (virus diluidos en DMEM + 1% SFB). Las células se incuban a 37°C hasta el siguiente día.

En varios puntos en el tiempo después de la infección, el medio se aspira y las células se lavan una vez con PBS. Se añaden 50 µl de 50%/50% acetona-metanol helado a cada pocillo seguido de incubación a -20°C durante 30 minutos. La mezcla de acetona se aspira y las células se lavan una vez con PBST (PBS + 0,1% Tween). Se añaden 50 µl de 2% BSA a cada pocillo seguido de incubación a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Se añaden 50 µl de una dilución 1:6000 de anti-NP en el tampón bloqueador seguido de incubación a TA durante 1 hora. La solución de anticuerpo se aspira y las células se lavan tres veces con PBST. Se añade anticuerpo secundario (cabra anti ratón) en una dilución 1:2000 en 50 µl de tampón bloqueador y la placa se incuba a TA durante 1 hora. La solución de anticuerpo se aspira y las células se lavan tres veces con PBST. Se añaden 50 µl de KPL True-Blue a cada pocillo y se incuba durante 10 minutos. La reacción se para aspirando el True-Blue y lavándolo una vez con dH₂O. El agua se aspira y se deja secar las células.

Los resultados (Figura 1) muestran que la cepa PR8-X puede crecer en títulos más altos en el mismo contexto de tiempo en comparación con la cepa wt PR8 de la que se deriva.

Características de crecimiento de virus recombinantes que contienen segmentos principales de PR8-X o wt PR8

Con el fin de probar la idoneidad de la cepa PR8-X como cepa donante para virus recombinantes, se producen virus recombinantes mediante genética inversa que contienen las proteínas HA y NA de una cepa pandémica H1 y los otros segmentos virales de PR8-X o PR8. Los títulos virales de estos virus recombinantes se determinan mediante ensayos FFA y HA como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Los resultados indican que los virus recombinantes que contienen segmentos virales de PR8-X crecen más rápido en células MDCK en comparación con virus recombinantes que contienen segmentos virales de la cepa PR8/34.

Características de crecimiento de cepa 105p30 en comparación con PR8-X

Las células MDCK se infectan con 105p30 y PR8-X en una multiplicidad de infección de 10^{-3} y las muestras se toman en varios puntos en el tiempo después de la infección. El título se determina mediante un ensayo FFA. Los resultados muestran que 105p30 crece incluso más rápido en células MDCK en comparación con PR8-X (Figura 6).

5 Características de crecimiento de virus recombinantes que contienen segmentos principales de 105p30 o wt PR8.

10 Con el fin de probar la idoneidad de la cepa 105p30 como cepa donante para virus recombinantes, se usa genética inversa para producir virus recombinantes que contienen los segmentos HA y NA de una cepa pandémica de gripe H1 y los segmentos del eje principal de la cepa 105p30 o wt PR8. Las células MDCK se infectan con los virus recombinantes en una multiplicidad de infección de 10^{-3} y las muestras se toman 1 hora, 12 horas, 36 horas y 60 horas después de la infección. Los títulos se determinan mediante ensayo de formación de foco o determinando las partículas de virus mediante detección en tiempo real PCR. Los virus recombinantes que contienen los segmentos principales del eje central de la cepa 105p30 crecen más rápido que los virus que se recombinan con los segmentos del eje principal de la cepa wt PR8. Esto muestra que la cepa 105p30 es una buena cepa donante para producir virus recombinantes de rápido crecimiento (Figura 7).

Rescate de virus de gripe usando segmentos del eje principal de dos cepas donantes

20 La eficacia de rescate de virus recombinantes de gripe que contienen los segmentos HA y NA de un virus de gripe H3 y los segmentos del eje principal de las cepas donantes 105p30 y PR8-X se prueba en células MDCK. Los virus recombinantes de gripe contienen segmentos del eje principal de las cepas donantes 105p30 y PR8-X, como se indica en la siguiente tabla:

25 Tabla 1

Eje principal #	PB1	PB2	PA	NP	M	NS
1	PR8-X	PR8-X	PR8-X	105p30	105p30	105p30
2	PR8-X	PR8-X	105p30	PR8-X	105p30	105p30
3	PR8-X	PR8-X	105p30	105p30	PR8-X	105p30
4	PR8-X	PR8-X	105p30	105p30	105p30	PR8-X
5	PR8-X	105p30	PR8-X	PR8-X	105p30	105p30
6	PR8-X	105p30	PR8-X	105p30	PR8-X	105p30
7	PR8-X	105p30	PR8-X	105p30	105p30	PR8-X
8	PR8-X	105p30	105p30	PR8-X	PR8-X	105p30
9	PR8-X	105p30	105p30	PR8-X	105p30	PR8-X
10	PR8-X	105p30	105p30	105p30	PR8-X	PR8-X
11	105p30	PR8-X	PR8-X	PR8-X	105p30	105p30
12	105p30	PR8-X	PR8-X	105p30	PR8-X	105p30
13	105p30	PR8-X	PR8-X	105p30	105p30	PR8-X
14	105p30	PR8-X	105p30	PR8-X	105p30	PR8-X
15	105p30	PR8-X	105p30	PR8-X	PR8-X	105p30
16	105p30	PR8-X	105p30	105p30	PR8-X	PR8-X
17	105p30	105p30	PR8-X	PR8-X	PR8-X	105p30
18	105p30	105p30	PR8-X	PR8-X	105p30	PR8-X
19	105p30	105p30	PR8-X	105p30	PR8-X	PR8-X
20	105p30	105p30	105p30	PR8-X	PR8-X	PR8-X

60 Los virus recombinantes de gripe que contiene un segmento principal de acuerdo con el número 3, 4, 10, 11, 14 y 16-20 son rescatables. Los virus de gripe que contienen el número de segmento principal 3, 4, 10, 11 o 16 consiguen títulos virales de menos de 10^2 UI/ml. Los virus de gripe que contienen los números del segmento principal 17 y 18 consiguen títulos virales de entre 10^2 y 10^6 UI/ml y los virus de gripe que tienen los números del segmento principal 19 y 20 consiguen títulos incluso de más de 10^6 UI/ml.

Estos datos muestran que los virus de gripe donde los segmentos PB1 y PB2 vienen de la misma cepa donante de gripe pueden mostrar una mayor eficacia de rescate en comparación con virus de gripe donde estos segmentos vienen de diferentes cepas donantes de gripe.

5 ***Características de crecimiento de virus recombinantes de gripe que contienen segmentos del eje principal de dos cepas donantes***

10 Se crean cepas recombinantes de gripe que contienen números del segmento principal 17, 18, 19 y 20 (como se muestra en la tabla 1 anterior) y los segmentos HA y NA de una cepa de gripe H3 (cepa 1). Como controles, se usan el virus de gripe H3 de tipo salvaje equivalente y un virus recombinante de gripe que comprende los mismos segmentos HA y NA y todos los segmentos del eje principal de PR8-X.

15 Además, se producen cepas recombinantes de gripe que contienen números del segmento principal 17 y 19 y el segmento HA y NA de un segundo virus de gripe H3 (cepa 1) o un virus pandémico de gripe H1 (cepa 3). Como controles para la cepa H3, se usan el virus de gripe H3 (cepa 3) de tipo salvaje equivalente y un virus recombinante de gripe que comprende los mismos segmentos HA y NA y todos los segmentos del eje principal de PR8-X. Para el virus pandémico de gripe H1, se usa un virus recombinante de gripe que comprende los segmentos HA y NA y todos los segmentos del eje principal de PR8-X.

20 Los virus recombinantes de gripe y los virus de control crecen en células MDCK y el título viral se mide por FFA en diferentes puntos en el tiempo. Para los virus recombinantes H3 (cepa 1) que contienen los segmentos 17, 19 y 20 y los virus de gripe H3 (cepa 3) que contienen los segmentos principales 17 y 19, los virus de gripe que contienen los segmentos del eje principal de dos cepas donantes crecen hasta títulos más altos en comparación con el virus de tipo salvaje y el virus recombinante que contiene los segmentos del eje principal de solamente una cepa donante (véase las figuras 11 y 12).

25 Para el virus pandémico de gripe H1, las cepas recombinantes de gripe que contiene los segmentos principales 17 y 19 crecen hasta títulos más altos en comparación con el control que contenía todos los segmentos del eje principal de PR8-X (véase figura 9).

30 Los datos muestran que los virus recombinantes de gripe que contienen los segmentos del eje principal de dos cepas donantes diferentes pueden mostrar mejores índices de crecimiento con virus recombinantes de gripe que contienen segmentos del eje principal de solamente una única cepa donante.

35 Los experimentos también se repitieron usando virus recombinantes de gripe que contienen el segmento principal 19 o los segmentos del eje principal de PR8-X en combinación con los segmentos HA y NA de cuatro cepas diferentes H1 o una cepa H3. Los resultados se muestran en la Figura 10.

40 ***Virus recombinantes de gripe con segmentos del eje principal de dos cepas donantes diferentes dan mayores producciones***

45 Para probar si los virus recombinantes de gripe que contienen los segmentos del eje principal de dos cepas donantes diferentes de gripe pueden también proporcionar producciones más altas, la producción de la cepa recombinante se prueba con HA-ELISA. Con este fin, se usan los mismos virus recombinante de gripe que se han descrito anteriormente que contienen segmento principal #19 y los segmentos HA/NA de H3 (cepa 2) y cepas de gripe H1. Como controles, se usan los virus de gripe de tipo salvaje equivalente y virus recombinantes de gripe que comprenden los mismos segmentos HA y NA y todos los segmentos del eje principal de PR8-X. Además, los títulos virales se confirman con un ensayo FFA.

50 Los resultados confirman que las cepas recombinantes de gripe que contiene los segmentos del eje principal de dos cepas donantes diferentes pueden crecer hasta producciones más altas en comparación con virus de gripe que contenían todos los segmentos principales de PR8-X (véase figuras 13 (A) y (C)). Además, los virus recombinantes de gripe que comprenden los segmentos del eje principal de dos cepas donantes también dan mayores producciones de HA (véase las figuras 13(B) y (D)).

55 Estos datos muestran que los virus recombinantes de gripe que contiene los segmentos del eje principal de dos cepas donantes dan mayores producciones en comparación con virus recombinantes de gripe que contiene segmentos del eje principal de solamente una única cepa donante.

60 **REFERENCIAS**

- 65 [1] WO2007/002008
 [2] WO2007/124327
 [3] WO2010/070098
 [4] Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
 [5] Rice et al. (200) Trends Genet 16:276-277

- [6] Herlocher et al. (1004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
 [7] Le et al. (2005) Nature 437 (7062):1108.
 [8] US-6468544.
 [9] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102: 16825-9.
 5 [10] WO2009/000891
 [11] Solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/273.151
 [12] Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., 1989, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
 [13] WO2011/012999
 10 [14] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.
 [15] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
 [16] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.
 [17] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
 [18] <http://www.atcc.org/>
 15 [19] <http://locus.umdnh.edu/>
 [20] WO97/37000.
 [21] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
 [22] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7
 [23] EP-A-1260581 (WO01/64846).
 20 [24] WO2006/071563
 [25] WO2005/113758
 [26] WO97/37001
 [27] WO02/28422
 [28] WO02/067983
 25 [29] WO02/074336
 [30] WO01/21151
 [31] WO02/097072
 [32] WO2005/113756
 [33] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91
 30 [34] Vaccines (eds. Plotkins & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0
 [35] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
 [36] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
 [37] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
 [38] Le et al. (2005) Nature 437(7062):1108.
 35 [39] WO2008/068631.
 [40] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy: 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [41] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
 [42] Nony et al. (2001) Vaccine 27:3645-51.
 [43] EP-B-0870508.
 40 [44] US 5948410
 [45] WO2007/052163
 [46] WO2007/052061
 [47] WO90/14837
 [48] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
 45 [49] Podda (2001) Vaccine 19:2673-2680.
 [50] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [51] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Resarch Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083
 50 [52] WO2008/043774.
 [53] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25
 [54] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
 [55] US-2007/014805
 [56] US-2007/0191314
 55 [57] Suli et al. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
 [58] WO95/11700
 [59] Patente de Estados Unidos 6.080.725
 [60] WO2005/097181
 [61] WO2006/113373
 60 [62] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
 [63] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77.
 [64] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304
 [65] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30
 [66] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.
 65 [67] Halperin et al. (1979) Am J Public Health
 [68] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140-234-8.

[69] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

[70] *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds. 1987) Suplemento 30.

[71] Smith & Waterman (1981). *Adv. Appl. Math.* 2:482-489.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (PA, A/New Caledonia/20/1999)

GATTTCGAAA TGGAGAGATTTTGTGCGCAATGCTTCAATCCGATGATTGTTCGAGCTTGCAGAAAAGGCAATGAAAG
 AGTATGGAGAGGACCTGAAAA TCGAAACAAACAAATTTGAGCAATATGCACCTCACTTGGAAAGTATGCTTCATGT
 ATTACAGATTTTCATTTTCATCAATGAGCAAGCGCAATCAATAATAGTAGAGCCTGAGGACCCAAATGCACCTTTAA
 AGCACAGATTTGAGATAATAGAGGGACGAGATCGTACAATGGCATGGACAGTTGTAACAGTATTGCAACACCA
 CAGGAGCTGAGAAACAAAGTTTCTGCCAGATCTGTATGATTACAAGAGAATAGATTCAATCGAGATTGGAGTGA
 CAAGGAGGGAAGTTCACATATACTATCTGGAAAAGGCCAAACAAATTAATCTGAGAAAGACACACATTCACATTT
 TCTCATTCACTGGCGAAGAAATGGCCACAAAGCCGATTACACTCTCGATGAAGAAAAGCAGGGCTAGGATTA
 CCAGACTATTCACCATAAGACAAGAAATGGCAAGCAGAGGCTTTTGGGACTCCTTTCGTGAGTCCGAAAGAGGG
 AAGAAACAAATTGAAGAAAGATTTGAAATCACAGGGACAATGCGCAGGCTCGCTGACCAAAGCCTTCCGCGGA
 TCTCTCTGCAATTGAGAAATTTAGAGCCTATGTGGATGGATTTGAACCGAACGGCTACATTGAGGGCAAGCTTCTC
 AAATGTCCAAAGAAATGCTAGAAATTTGAGCCTTTTGGAAACAAACCCAGCAATAGACTTCCGGATG
 GGCTCCTTTGTTTTAGCGGTCAAAATTCCTGCTGATGGATTTTAAAAATTAAGCATTGAGGATCCAAATCATG
 AAGGAGAGGGAAATACCCTATATGATGCAATCAAGTGTATGAGAACATCTTTGGATGGAAAGAACCTCTGTTG
 TCAAGCCACACGGGAAGGGAAATAATCCGAATTACTGCTGCTATGGAAGCAGGATTTGGAAGAGCTGCAGGACA
 TTGAGAGTGGAGGAAGATTTCAAGAACAAAAACATGAAAAAACGAGTCAGCTAAAGTGGGCACTTGGTGAA
 ACATGGCACCAGAGAAGTGGATTTTGTGACTGTAAAGATATAAGCGATTTGAGCAATATGATAGTGACGAAC
 CTGAATTAAGGTGATTTCAAGTTGGATCCAGAA TGAGTTCAACAAGGCATGCGAGCTGACCGATTCAATCTGGA
 TAGAGCTCGATGAGATTTGAGAAGATGTGGCCCGATTGAACACATTGCAAGCATGAGAAGAAATTACTTCACAG
 CTGAGGTGTCCTTGCAGAGCCACAGAATATATAATGAAGGGGGTATACATTAATACTGCTTTGCTTAATGCAT
 CCTGTGCAGCAATGGATGATTTCCAACATAATCCCATGATAAGCAATGTAGAACTAAAGAGGGAAAGGAGAAAGA
 CCAATTTGTACGGCTTCATCGTAAAGGAAGATCTCACTTAAGGAATGACCCGATGTGGTAAAC TTTGTGAGCA
 TGGAGTTTTCCCTCACTGACCCAAGACTTGAGCCACACAAATGGGAGAGTACTGTGTTCTTGAGATAGGAGATA
 TGCTTCAAGGAGTGAATAGGCCAAGTGTCAAGGCCCATGTTCTTGTATGTAAGGACAAATGGAACCTCAAAAA
 TTAATAATGAAATGGGGAATGGAGATGAGGCGTTCCTCCCAATCCCTTCAACAAATAGAGAGCATGATGGAAG
 CTGATCTCCGTCAAGGAGAAAGACATGACAAAAGAGTTTTTTGAGAATAGATCAGAAACATGGCCCATTTGGAG
 CAGACCAAAAGGAGTGGAGAGAGGTTCCATTTGGGAAAGTATGAGGACACTATTGGCTAAGTCAATTAATA
 GTCTGTATGCATCTCCACAATTAGAAGGATTTTCAGCTGAGTCAAGAAAGTTGCTCCTCATTGTTCCAGGCTCTTA
 GGGCAATCTGGAACCTGGGACCTTTGATCTTTGGGGGGCTATATGAAGCAATTTGAGGAGTGCCTGATTAATGATC
 CCTGGGTTTTGCTTAATGCTTCTTGGTTCAACTCCTTCAACACATGCATTGAGATAGCTGGGCAATGCTACT
 ATTTACTATCCATACTGTCCAAAAA

SEQ ID NO: 2 (PBI, A/New Caledonia/20/1999)

AATGGATGTCAATCCGACATTACTTTTTCTTAAAGTGCCAGCACAAAAATGCTATAAGCACAACTTTTCCTTATAC
 TGGTGACCTTCCTTACAGCCATGGGACAGGAACAGGGTACACCATGGATACAGTCAACAGGACACATCAGTACTC
 AGAAGAGGGAAGATGGACAAAAAATCCGAAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCAATGATGGGCCACTACAAA
 AGACAATGAACCAAGTGGCTATGCCCAAACAGATTTGTGATTAAGAAGCAATGGCTTTCCCTGGAGGAATCCCATCC
 TGGTATTTTTGAAAACCTCTGTATTGAAACAAATGGAGGTTGTTCCAGCAAAAGGGTGGACAACTGACACAAGG
 CAGACAGACCTATGACTGGACTCTAAATAGGAACAGCCTGCTGCCACAGCATTGCCCAACACTATAGAAGTGT
 CAGATCAACCGGCTCATAGCAAAATGATCTGGGAGGCTAATAGACTTCTTAAAGATGTAATGGAGTCTGATGGA
 CAGAGACGAAGTAGAGATCACAACCTATTTTCAAAGAAAAGAGGAGAGTGAAGACAAATGTAACAAAAAATGGT
 GACCCAAAGAACAAATAGCAAAAAGAAACATAAATAGACAAAAGAGTTACCTAATTAGGGCATTAACCTGAA
 CACAATGACCAAAGATGCTGAGAGGGGAAACTAAAACGCAGAGCAATGCAACCCAGGAATGCAAAATAGGGG
 GTTTGTACTTTGTTGAGACTGGCAAGAACATATGTGAAAAGCTTGAACAATCAGGGTTGCCAGTTGGAGG
 AAATGAAAAGAAAGCAAGTTAGCAAAATGTTGTAAGGAAGATGATGACCAACTCCAGGACTGAAATTTCTTT
 CACCATCCTGGAGATAACACAAAA TGGAAACGAAAATCAAACCCCTAGAAATGTTCTTGGCCATGATCACAATAT
 AACCAAAAA TCAAGCTGAAATGGTTCAGAAATATCTAAGTATGCTCCAAATATGTTTTCAAACAAAAATGGCGAG
 CATAGATTTGAAATATTTCAATGATTAACATAAAAAGAAATGAAAAAATCCGGCCATTATTAATAGATGGAAC
 TGCAATCATTGAGTCCCTGGAATGATGATGGGCAATGTTCAATATGTTAAGCACCCTTTGGGGCTCTCCATCTGAA
 TCTTGGGCAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGTCTTCAATCGCTGATGATTTGCTCTGAT
 TGTGAATGCACCCAACTATGCAGGAATTCAGCTGGAGTTGACAGGTTTTATCGAACCTGTAAGCTGCTCGGAAT
 TAATATGAGCAAAAAGAGTCTTACATAAACAGAACAGGTACCTTTGAGTTACAGAGCTTTTTCTATCGSTTATGG
 GTTTGTTGCCAATTTGAGCATGGAGCTTCTAGTTTTGGGGTGTCTGGGGTCAATGAATCTGCAGACATGAGTAT
 TGGAGTCACTGTATCAAAAACAATATGATAAACAAATGACCTTGGCCAGCAACTGCTCAAAATGGCCCTTCAGTT
 ATTTATAAAGATTACAGGTACAGTATCGATGCCACAGAGGTGACACACAAATACAAACCCGGAGATCATTTGA
 GATAAAGAAACTATGGGACCAACCCGCTCCAAGCTGGGCTGTTGGTCTCTGATGGAGGCCCAATTTATATAA
 CATTAGAAATCTCCATATCTCTGAAGTCTGCTTGAATGGGAGTTGATGGATGAGGATTAACAGGGGGCTTTATG
 CAACCATTGAACCCGTTTTGTCAGTCAAAAAGAGATTGAATCAGTGAACAATGCAGTGAATGATGATGATGATGATG

TCCAGCCAAAAATATGGAGTATGACGCTGTTGCAACAACACACTCCTGGGTCCCAAAAAGGAATCGATCCATTTT
 GAAATACGAGCCAAAGGGGATACCTTGGAGTATGAGCAATGTATCAGAGGTGCTGCAATTTATTTGAAAAATCTT
 CCCAAGTAGCTCATACAGAAGCAGTTGGAAATATCCAGTATGGTATAGAGGCTATGGTTTCCAGAGCCCGAATTTGA
 TGCACGGATTGATTTTCGAACTGGAAGGATAAAAAAGAGGAATTCGCTGAGATCATGAAGACCTGTTCACCAT
 TGAAGACCTCAGACGGCAAAAATAGGGAATTTGGCTTGTCTTCATGAAAA

SEQ ID NO: 3 (PB2, A/New Caledonia/20/1999)

AAATATGGAAAGAATAAAGAGCTAAGGAATCTGATGTCACAACTCTCGACTCGCGAGATACTTACAAAAACTACT
 GTAGACCATGCCCCATAAACAAGAAATACACATCAGGAAGACAGGAGAAAAACCCATCACTTAGAATGAAATGG
 ATGATGGCAATGAAATACCAATTAACAGCAGATAAAAGGATAACGGAAATGATTCCTGAAAAGAAATGAGCAAGGA
 CAGACATTAAGAGTAAAGTGAATGATGCCGGATCAGACCGAGTATGATATCACCCCTGGCTGTGACATGGTGG
 AACAGAAATGGACCAGTGGCAAGTACTATTCACATACCAAAAATCTACAAAATTAATTTGAAAAGGTTGAAAAGG
 TTAATAACATGGAACCTTTGGCCCTGTACACTTTAGAAACCAAGTCAAAAATACGCCGAAAGAGTGCACATAAATCTCT
 GGTATCGACACTCAGCCCAAGGAGGACAGGATGTAATTAAGAAAGTGTGTTTCCCTAATGAAGTGGGAGCC
 AGAATACTAACATCAGAATCGCAATTAACGATAACCAAGGAGAAAAAGAAACTCCAGAAATTTGAAAAATTTCC
 CCTTTGATGGTTGCAATACATGTTAGAGAGGGAATTTGTCGCAAAAACGAGATTTCTCCCGGTTGCTGGTGGAAACA
 AGCAGTGTGTACATTAAGTTTTGCATTTAACACAGGGGACATGCTGGGAGCAGATGTACACTCCAGGTGGGGAG
 GTGAGGAATGATGATTTGATCAAAGCCTAATTTATGCTGCTAGGAACATAGTGAGAAGAGCTGCACGTATCAGCA
 GATCCACTAGCATCTTTATTAGAAAATGTGCCATAGCACACAGATTTGGTGGGACAAGGATGGTGGATATTTCTCAGG
 CAAAATCCAACAGAAGAACAGCTGTGGATATATGCAAAAGCAGCAATGGGGCTGAGAATCAGTTTCATCTCTCAGT
 TTTGGCGGTTTACATTTAAGAGAAACAAGTGGATCATCAGTCAAAAAGGAGGAAGAAAGTGTCTCAGGGCAATCTG
 CAAACATTTGAAGCTAATCTGTGCAAGAGGATAAGAAAGTTCACAAATGGTTGGGAAAAGGGCAACAGCTATACCTC
 AGAAAAGCAACAGGAGATGATTAACATAATAGTGTAGTGGAAAGAGACCAACAGTCAATAGTCGAAGCAATAGTT
 GTAGCAATGGTATTTCCACAAGAAGATTGCATGGTAAAGCAGTTAGAGGTGATCTGAATTTCTGTTAATAGAGCG
 AATCAGCGGTTGAATCCCATGCATCAACTTTTGAGACATTTTCAGAAAGGATGCTAAAGTACTTTTCTTAAATTTGG
 GGAATTTGAACCTATCGACAATGTGATGGGAATGATTTGGATATTACCTGATATGACTCCAAGTACCGAGATGTCA
 ATGAGAGGAGTGTGAGTGTGCAAAAATGGGTGTAGATGAATCTCCAATGCTGAAAAGGAGTGTGGTGTGAGCATTGAC
 CGTTTTTTGAGAGTCCGGGACCAAAAGAGGAAAATGACTACTGTCTCCAGAGGAAGTCAAGTGAACACAGGGAAACA
 GAGAAATGACAATAACTTACTCTTCAATCAATGATGTGGGAGATTAATGGCCCTGAGTCAAGTGTGATCAATACC
 TATCAGTGGATCATCAGAAACTGGGAGACTGTTAAAATTCAGTGGTCTCAGAACCTTACAATGCTATACAAATAAA
 ATGGAATTCAGGCCATTTAGTCTCTAGTCCCTAAGGCCATTAGAGGCCAATACAGTGGGTTTGTGTAAGACTCTA
 TTTCAACAAAATCAGGGATGTGCTTGGGACCTTTGACACAACCTCAGATAATAAAAATTTCTTCCCTTTGCAAGCCGCT
 CCACCAAAGCAAAGTAGAATGCAATCTCATCTATTGACTGTGAATGTGAGGGGATCAGGAATGAGAATACTTGTA
 AGGGGTAATTTCCAGTATTTCAACTACAAACAGACCCTAAGAGACTCACAGTCTCCGAAAAGGATGCTGGCACT
 TTAACGTAAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTGGAGTGGAAATCTGCTTCTTAAGGGGATTTCTCATCTAGGCAAA
 GAAGATAGAAGATATGGCCAGCATTAAGCATCAATGAATTTAGCAACCTTGCAGAAAAGGGGAAAAAGCTAATGTG
 CTAATTTGGGCAAGGGGACGTAGTGTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACA
 GCGACCAAAAAGAAATTCGGATGGCCATCAATTAATTTCCGAATRAATTTAAA

SEQ ID NO: 4 (NP, A/New Caledonia/20/1999)

ATCACTCACTGAGTGCATCAAAGTCAATGGCGTCCCAAGGCACCAAAACGGTCTTACGAAACAGATGGAGACTGATG
 GGGAAACGCCAGAAATGCAACTGAAATCAGAGCATCCGTCGGAAGAAATGATTGGTGGAAATTTGGGCGATTTCTACATCC
 AAATGTGCACCAGCTTAAACTCAATGATTTATGAGGGACGACTGATCCAGAACAGCTTGACAATAGAGAGAAATGG
 TGCTCTCTGCTTTTGATGAGAGGAGGAATAAATATCTGGAAGAACATCCAGCGCGGGGAAAGATCCTAAGAAAA
 CTGGAGGACCCATATAACAAGAGAGTAGATGGAAAGTGGGTGAGGGAACTCGTCTTTATGACAAAAGAAATAA
 GCGGGATTTGGCGCCAAAGCCAAACAAATGGTGTGATGCAACCGCTGGTTTGACTCACAATTATGATCTGGCATCTTA
 ATTTGAAATGATACAACCTTACCAGAGGACAAGAGCTCTTGTCCGACCCGGAATGGATCCAGGATGTGCTCTTTGA
 TGCAAGGTTCAACTCTCCCTAGAAGATCTGGAGCAGCAGGCGCTGCAGTCAAAGGAGTTGGGACAATGGTGTGG
 AGTTAATCAGGATGATCAAACGTGGGATCAATGACCGAAACTTCTGGAGGGGTGAGAATGGAAGAAAAACAAGGA
 TTGCTTATGAGAGAAATGTGCAACATCTCAAAGGAAAAATTTCAAACAGCTGCACAAAAAGCAATGATGGATCAAG
 TGAGAGAAAGCCGGAACCCAGGAATGCTGAGATCGAAGATCTCACTTTTCTGGCACGGTCTGCACCTCATATTTAA
 GAGGTCAGTTGCTCAAACTCTTGCTGCTGCTGCTGTGTGATGGACCAGCCGTAGCCAGTGGGTACGACPTTCG
 AAAAAGAGGGATACTCTTTGGTAGGGGTAGACCTTTTAAACTGCTTCAAACCAAGTCAAGGTATACAGCCCTAATCA
 GACCAAAACGAGAAATCCCGCACACAAGAGTCAAGTGGTGGATGGCATGCAATTTCTGCTGCATTTGAAGATCTAA
 GAGTGTCAAGCTTATCAGAGGGACAAGAGTACTTCCAAGGGGAAAGCTCTCCACTAGAGGAGTACAAAATGCTT
 CAAAATGAAAACATGGATGCTATTGTATCAAGTACTCTTGAAGTGAAGAACAGATACTGGGCCATAAGAAACAGAA
 GTGGAGGGAACACTAATCAACAAAGGGCTCTGCGGGCAAAATCAGCACACAACCTACGTTTCTGTGCAGAGAA
 ACCTCCCATTTGACAAAACAACCATCATGGCAGCATTCAGTGGAAATACGGAGGGAAAGAACATCAGACATGAGGG
 CAGAAATCAAAAAGATGATGGAAAGTGAAGACCAAGAAAGTGTCTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTTGAGCTCT
 CGGACGAAAAGGCAACGAAACCCGATCGTGCCTCTCTTTGACATGATGATGAAGGATCTTATTTCTTCGAGAGACA
 ATGACAGGAGTACGACAAATTAATGAA

SEQ ID NO: 5 (M, A/New Caledonia/20/1999)

GATGAGTCTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCGTCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGC
 ACAGAGACTTGAAAATGCTTTGCTGGAAAGAATACCGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAAGACC
 AATCCTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCA
 GCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAATGGGGATCCAAAATAATATGGACAGAGCAGTTAAACTGTA
 TCGAAAGCTTAAGAGGGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGAAATAGCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTGC
 CAGTTGTATGGGACTCATATACAACAGGATGGGGCTGTGACCACCGAATCAGCATTGGCCCTTATATGCGCAAC
 CTGTGAACAGATTGCGGACTCCCAGCA TAAGTCTCATAGGCCAAATGGTAAACAACAACCAACCCATTAATAAGACA
 TGAGAACAGAATGGTTC TGGCCAGCAC TACAGCTAAGGCTATGGAGCAATGGCTGGATCGAGTGAACAAGCAGC
 TGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCCAGGCAGATGGTGCAGGCCAATGAGAGCCATTTGGGACTCATCTAGCTC
 TAGCACTGGTCTGAAAAATGATCTCCTTGAAAAATTTGCAGGCCATCAGAAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACG
 ATTCAAGTGATCCTCTTTGTTGTTGCGCAAGTATAATTGGGATTGTGCACCTGATATTGTGGATTATTGATCGCC
 TTTTTCCAAAAGCATTATCGTATCTTTAAACACGGTTTAAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAAGGATACCAGAGT
 CTATGAGGGAAAGATATCGAGAGGAACAGCAGAAATGCTGTGGATGTGACGATGGTCATTTTGTGACATAGAGC
 TAGAGTAAA

SEQ ID NO: 6 (NS, A/New Caledonia/20/1999)

ATGGATTCCACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGATTGCTTCTTTGGCATGTCCGCAAAACAAGTTGCAGACCAA
 GACTAGGCGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAAGTCTCTAAAGGGAAAGAGGCGAGCCTCTC
 GGTCTGAACATCGAAAACAGCCACTTGTGTTGGAAAGCAAAATAGTAGAGAGGATTCTGAAAAGAAGAAATCCGATGAG
 GCATTTAAAATGACCATGGCCTCCGCACTTGCCTCGCGGTACCTAACTGACATGACTATTGAAGAAAATGTC AAGG
 GACTGGTTTCATGCTCATGCCAAAGCAGAAAGTGGCTGGCCCTCTTTGTGTCAGAAATGGACCAGGCGATAATGGAT
 AAGAACATCATACTGAAAAGCGAAATTCAGTGTGATTTTGGACCGGTGGAGAAATCTGACATTACTAAGGGCTTTC
 ACCGAAGAGGGAGCAATTTGTTGGCGAAATTTCAACATTGGCTTCTCTTCCAGGACATACTAATGAGGATGTCAA
 AATGCAATTTGGGGTCTCATCGGGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGA
 TTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGACTGGGGGACCTCCATTCACCTCCAACACAGAAAACGGAAAAATGGCGGGAAACA
 ATTAGGTCAGAAAGTTTGAAGAAAATAAGATGGCTGATTTGAAGAAAGTGGAGCATAAAATTTGAAGACGACAGAAATAG
 TTTTGAAGCAAAATAACATTTATGCAAGCATTACAGCTATTGTTTGAAGTGGAAACAAGAGATTAGAACGTTTTTCGTT
 TCAGCTTATTTAATGATAA

SEQ ID NO: 7 (HA, A/New Caledonia/20/1999)

CCAAAATGAAAGCAAAACTACTGGTCTGTTATGTACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATA TGTATAGGCT
 ACCATGCCAACAACTCAACCGACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGAAATGTGACAGTGCACACACTCTGTCAACC
 TACTTGGAGACAGTCAAAATGGAAJACTATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAAATGGGTAATGTCAGCG
 TTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAAATGCGAATTACTGATTTC CAAGGAATCATGGTCTACATTTGTAGAAA
 CACCAAACTCTGAGAAATGGAAATGTTACCCAGGGTATTTCCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTTAGT
 CAGTATCTTCAATTTGAGAGATTGCAAAATATCCCCAAAGAAAGTCTATGGCCCAACACACCGTAAACCGGAGT
 CAGCATCATGCTCCCAATATGGGAAAAGCAGTTTTCACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAAGAAATGGT
 ACCCAACCTTGAGCAAGTCCATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAAGTCCCTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGC
 CTAACATAGGGAACCAAAAGGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCAATTATAGCA
 GAAGATTCAACCCAGAAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAAATCAACTACTACTGGACTC
 TGCTGGAACCTGGGGATACAATAATTTTGGGCCAAATGGAAATCTAATAGCGCCATGGTATGCTTTTGCACCTGA
 GTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAATGCACCAATGGATGAAATGTGATGCGAAGTGTCAAAACACCTC
 AGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCCTTCCAGAAATGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCA
 GGAGTGC AAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATCAATCCAGAGGTTTGTFTGGAGCCA
 TTGCCGGTTTCATTTGAAGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAAATGAGCAAG
 GACTGGCTATGCTGCAGTCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAAAACAAGGTGAATTTCTGTAA
 TTGAGAAAAATGAACACTCAATTTACAGCTGTGGGCAAGAATTCACAAAATTTGAAAAGAAGGATGGAAAACTTAA
 ATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTAGACATTTGGACATAATAATGCAGAAATTTGTGGTTCTACTGGAAAATGAAA
 GGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAAATCTGTATGAGAAAATGAAAAGCCAAATTAAGAAATAATGCCA
 AAGAAAATAGAAAACGGGTGTTTTGAATTTCTATCAAGTGAACAAATGAAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGAA
 CTTATGACTATCCAAAATATTTCCGAAGAAATCAAAGTAAACAGGGAGAAAAATTTGATGGAGTGAATTTGGAAATCAA
 TGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCCAGTTCCTGGTCTTTTGGTCTCCTGGGGGCAA
 TCAGCTTCTGGATGTGTTCCAAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAAATATGCATCTGAGACCAGAAATTTAGAAAATATAA
 GAA

SEQ ID NO: 8 (NA, A/New Caledonia/20/1999)

AATGAATCCAAATCAAAAAATAATAACCATTTGGATCAATCAGTATAGCAATCGGAATAATTAGTCTAATGTTGCA
 AATAGGAAAATATTTTCAATATGGGCTAGTCACTCAATCCAAACTGGAAATGAAAACCAACTGGAGTATGCAA
 CCAAAGAATCATCAGATATGAAAAACAGCACCTGGGTGAATCACAATATGTTAATATTAACAACACTAATGTTGT
 TGCTGAAAAGGACAAAACCTCAGTGACATTTGGCCGGCAATTCATCTCTTTGTTCTATCAGTGGATGGGCTATATA

CACAAAAGACAACAGCATAAGAATTGGCTCCAAAGGAGATGTTTTTGTGCATAAGAGAACCTTTTCATATCATGTTCTC
TCACTTGGAAATGCAGAACCTTTTTTCTGACCCAAAGGTGCTCTATTAATGACAAAACATTCAAATGGGACCGTTAA
GGACAGAAAGTCCCTTATAGGGCCCTTAATGAGCTGTCCCTTAGGGTGAAGCTCCGTCGCCATACAAATCAAAGTTTGA
ATCAGTTGCATGGTCAGCAAGCGCATGCCATGATGGCATGGGCTGGTTAAACAATCGGAATTTCTGGTCCAGACAA
TGGAGCTGTGGCTGTACTAAAATACAACGGCATAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAAAAAGCGAATATTAAG
AACACAAGAGTCTGAATGTGTCTGTGTGAACGGGTCATGTTTCACCATAATGACCGATGGCCCGAGTAATGGGGC
CGCTCGTACAAAATCTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAAATTTCA
TTATGAGGAATGTTCTGTACCAGACACTGGCACAGTGTGTGTATGCAGGGACAACCTGGCATGGTTCAAA
TCGACCTTGGGTGCTTTTTAATCAAAAACCTGGATTATCAAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTGTTCGGTGACAA
TCCGCGTCCCAAAGATGGAGAGGGCAGCTGTAATCCAGTGACTGTTGATGGAGCAGACGGAGTAAAGGGGTTTC
ATACAAATATGGTAATGGTGTGGATAGGAAGGACTAAAAGTAAACAGACTTAGAAAAGGGGTTTGAGATGATTTG
GGATCCTAATGGATGGACAGATACCGACAGTGTATTTCTCAGTGAACAGGATGTTGGCAATAACTGATTTGGTC
AGGGTACAGCGGAAGTTTCGTTCAACATCCTGAGTTAACAGGATTTGGACTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGA
GTAGTACAGAGGACTCCCTAGAGAAAATACAACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGCATTTCTTTTGGGCGTAAA
TAGTGATACTGCAAACTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCCTTCAACATTGACAAGTAG

SEQ ID NO: 9 (PA, PR8-X)

AGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAAATGGAAGATTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCGATGATTGTGCGAGCTTGGC
GAAAAACAATGAAAGATATGGGGAGGACCTGAAAATCGAAACAACAATTTGCAGCAATATGCACCTCACTTG
GAAGTATGCTTTCATGTATTCAGATTTTCACTTCACTCAATGAGCAAGGCGAGTCAATAATCGTAGAACTTGGTGAT
CCAAATGCACCTTTTGAAGCACAGATTTGAAATAATCGAGGGAAAGAGATCGCACAATGGCCTGGACAGTAGTAAAC
AGTATTTGCAACACTACAGGGGCTGAGAAAACCAAGTTTCTACCAGATTTGTATGATTACAAGGAGAAATAGATTT
ATCGAAATTTGGAGTAAACAAGGAGAGAATTCACATATACTATCTGGAARAGGCCAATAAAATTAATCTGAGAAA
ACACACATCCACATTTCTCGTTCACTGGGGAAGAAATGGCCACAAAGCAGACTACACTCTCGATGAAGAAAAGC
AGGGCTAGGATCAAACCAGACTATTCACCATAAGACAAGAAATGGCCAGCAGAGGCTCTGGGATTCCTTTCGT
CAGTCCGAGAGAGGAGAGAGACAATTTGAAGAAAGGTTTGAATCACAGGAACAATGCGCAAGCTTGGCCGACCAA
AGTCTCCCGCCGAACCTTCCAGCCCTGAAAATTTAGAGCCATATGTGGATGGATTGGAACCGAAACGGCTACATT
GAGGGCAAGCTGTCTCAAATGTCCAAAGAAATGAAATGCTAGAAATTTGAACCTTTTTTGAAAAACAACACCAGACCA
CTTAGACTTCCGAATGGGCCCTCCCTGTCTCAGCGGTCCAAATTCCTGCTGATGGATGCCCTTAAAAATTAAGCATT
GAGGACCCAAAGTCATGAAGGAGAGGGAATACCCTATATGATGCAATCAAATGCATGAGAACATCTTTGGATGG
AAGGAACCCAAATGTTGTTAAACCCACACGAAAAGGGAATAAATCCAAATTAATCTTCTGTCATGGAAACAAAGTACTG
GCAGAACTGCAGGACATTTGAGAATGAGGAGAAAATTTCCAAAGACTAAAAATATGAAGAAAACAAGTCAGCTAAAG
TGGGCACTTGGTGAGAACATGGCCACGAAAAGGTAGACTTTGACGACTGTAAGAATGTAGGTGATTTGAAGCAA
TATGATAGTGAATGAACAGAAATTTGAGGTCGCTTGAAGTTGGATTGAGAAATGAGTTTAAACAAGCATGGCAACTG
ACAGATTAAGCTGGATAGAGCTCGATGAGATGGAGAAAGATGTGGCTCCAAATGAAACACATTGCAAGCATGAGA
AGGAATTTTACATCAGAGGTTGCTCACTGCAGAGCCACAGAAATACATAATGAAGGGGGTGTACATCAATACT
GCCTTGCTTAAATGCACTTTGTGCAGCAATGGATGATTTCCAAATTAATTTCCAAATGATAAGCAAGTGTAGAACA
GAGGAAAGGCGAAAGACCAACTTGTATGGTTTCACTATAAAAAGGAAAGATCCCACTTAAAGGAATGACACCCAGCTG
GTAAACTTTGTGAGCATGGAGTTTCTCTCACTGACCCAAAGACTTGAACCACATAAAATGGGAGAAGTACTGTGTT
CTTGAGATAGGAGATATGCTTATAAGAAGTGCCATAGGCCAGGTTTCAAGGCCATGTTCTTGTATGTGAGAACA
AATGGAACCTCAAAAATTAATAAGAAATGGGGAATGGAGATGAGGCGTTGCCCTCCTCCAGTCACTTCAACAAT
GAGATATGATGAAAGCTGAGTCCCTGTCAAAGAGAAAAGACATGACCAAAAGAGTTCTTTGAGAACAAATCAGAA
ACATGGCCCATTTGGAGAGTCCCCAAAGGAGTGGAGGAAAGTTCCATTGGGAAGGTCGACAGGACTTTATTAGCA
AAGTCCGTTATCAACAGCTTGTATGCATCTCCACAACATAGAAGGATTTTCACTGAAATCAAGAAAACCTGCTCTT
ATCGTTCAAGGCTTTAGGGACAACCTTGAACCTGGGACCTTTGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATTTGAGGAG
TGCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCTTCTTGGTTCAACTCCTTCTTACACATGCAATGAGTTAG
TTGTGGCAGTGTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 10 (PB1, PR8-X)

AGCGAAAGCAGGCAAAACCTTTGAAATGGATGTCATCCGACCTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAAACACAAAATGCT
ATAAGCACAACCTTCCCTTATACTGGAGACCCCTCCTTACAGCCATGGGACAGGAAACAGGATACACCATTGGATACT
GTCACACAGGACACATCAGTACTCAGAAAAGGGAAGATGGACAACAACACCGAAACTGGAGACCCGCAACTCAAC
CCGATTGATGGGCCACTGCCAGAAGACAATGAACCAAGTGGTTATGCCAAAACAGATTGTGTATTGGAGGCGATG
GCTTCCCTTGGAGAAATCCCAATCCTGGTATTTTGAAAAATCGTGTATTGAAACGATGGAGGTTGTTCAGCAAAACA
CGAGTAGACAAGCTGCACAAAGGCCGACAGACCTATGACTGGACTCTAATAGAAAACCAACCTGCTGCAACAGCA
TTGGCCAAACACAATAGAAGTGTTCAGATCAAAATGGCCCTCACGGCCAATGAGTCTGGAAGGCTCATAGACTTCCCT
AAGGATGTAATGGAGTCAATGAACAAAGAAAGAAATGGGGATCACAACCTCAATTTTTCAGAGAAAGAGACGGGTGAGA
GACAATAGACTTAAGAAAATGATAACACAGAGAACAATGGGTAAGAAAGAGCAGAGATTGAACAAAAGGAGTTAT
CTAATTAGAGCATGACCTTGAACACAATGACCAAAAGATGCTGAGAGAGGGAAAGCTAAAACGGAGAGCAATGCA
ACCCCAAGGATGCAAAAATAGGGGGTTTGTATACTTTGTTGAGACACTGGCAAGGAGTATATGTGCAAACTTGA
CAATCAGGGTTGCCAGTTGGAGGCAATGAGAAGAAAGCAAGTTGGCAATGTTGTAAGGAAGATGATGACCAAT

TCTCAGGACACCGAACTTTCTTTCAACATCACTGGAGATAACACCAAATGGAACGAAAATCAGAACTCCTCGGATG
TTTTTGGCCATGATCACATATATGACCAGAAATCAGCCCGAATGGTTTCAGAAATGTTCTAAGTATTGCTCCAAATA
ATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTGGGAAAAGGTATATGTTTGAGAGCAAGAGTATGAAACTTAGAAC TCAA
ATACCTGCAGAAATGCTAGCAAGCATCGATTTGAAATATTTCAATGATTCAACAAGAAAAGAAATGAAAAATC
CGACCGCTCTTAATAGAGGGGACTGCATCAATTGAGCCCTCGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGTTAAGCACT
GTATTAGGCGTCTCCATCCTGAATCTTTGGACAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGTCTCAA
TCCTCTGACGATTTTGCTCTGATTGTGAATGCACCCAATCATGAAGGGATTCAAGCCGAGATCGACAGGTTTTAT
CGAACCTGTAAGCTACTTTGGAATCAATATGAGCAAGAAAAGTCTTACATAAACAGAACAGGTACATTTGAATTC
ACAAGTTTTTTCTATCGTTATGGGTTTGTGGCCAAATTCAGCATGGAGCTTCCCAGTTTTGGGGTGTCTGGGATC
AACGAGTCAGCGGCATGAGTATTGGAGTTACTGTTCATCAAAAACAATATGATAAAACAATGATCTTGGTCCAGCA
ACAGCTCAAATGGCCCTTCAGTTGTTCATCAAAGATTACAGGTACACGTACCATGCCATAGAGGTGACACACAA
ATACAAAACCCGAAGATCAATTTGAAATAAAGAAAATGTGGGAGCAAAACCGTTCCAAAAGCTGGACTGCTGGTCTCC
GACGGAGGCCAAAATTTATACAACAATTAGAAAATCCACATATCCGAAAGTCTGCCAAAATGGGAAATGATGGAT
GAGGATTACCAGGGGCGTTTTATGCAACCCACTGAACCCATTTGTGAGCCATAAAGAAAATGAAATCAATGAACAA
GCAGTCAAATGGCCCTTCAGTTGTTCATCAAAGATTACAGGTACACGTACCATGCCATAGAGGTGACACACAA
ATACAAAACCCGAAGATCAATTTGAAATAAAGAAAATGTGGGAGCAAAACCGTTCCAAAAGCTGGACTGCTGGTCTCC
GACGGAGGCCAAAATTTATACAACAATTAGAAAATCCACATATCCGAAAGTCTGCCAAAATGGGAAATGATGGAT
GAGGATTACCAGGGGCGTTTTATGCAACCCACTGAACCCATTTGTGAGCCATAAAGAAAATGAAATCAATGAACAA
GCAGTCAAATGGCCCTTCAGTTGTTCATCAAAGATTACAGGTACACGTACCATGCCATAGAGGTGACACACAA
CCAAAAGAAAATCGATCCATCTTGAATACAAGTCAAAGAGGAGTACTTTGAGGATGAACAAATGTACCAAGGTGC
TGCAATTTATTTGAAAAATTTCTCCCGAGGATTCATACAGAAGACAGTGGGATATCCAGTATGGTGGAGGCT
ATGGTTCCAGAGCCCGAATTTGATGCACGGATTTGATTTGAAATCTGGAAGGATAAAGAAAAGAGATTCAC TGAG
ATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCATGAAAA
ATGCCCTGTTCTACT

SEQ ID NO: 11 (PB2, PR8-X)

AGCGAAAGCAGGTCAATTAATTTCAATATGGAAGAATAAAAAGAACTAAGAAAATCTAATGTGCGAGTCTCGCACCC
CGCGAGATACTCAAAAAACCACCGTGGACCATAATGACCATAATCAAGAAGTACACATCAGGAAGACAGGGAAG
AACCCAGCACTTAGGATGAAATGGATGATGGCAATGAAATATCCAATTACAGCAGACAAAGAGGATAACGGAAATG
ATTCCTGAGAGAAATGAGCAAGGACAAACTTTATGGAGTAAAATGAATGATGCCCGATCAGACCGAGTGTGGTA
TCACCTCTGGCTGTGACATGGTGGAAATAGGAATGGACCAATAACAAATACAGTTTCATTTCCAAAAATCTACAAA
ACTTATTTTGAAGAAGTAGAAAAGCTAAAGCATGGAACCTTTGGCCCTGTCCATTTAGAAAACCAAGTCAAAAAT
CGTCGGAGATTGACATAAATCCTGGTTCATGCAGATCTCAGTGGCAAGGAGGCACAGGATGTAATCATGGAAGTT
GTTTTCCCTAACGAAGTGGGAGCCAGGATACTAACATCGGAATCGCAACTAACGATAACCAAGAGAAAGAAAGAA
GAACTCCAGGATTGCAAAAATTTCTCCTTTGATGGTTGCATACATGTTGGAGAGAGAACTGGTCCGCAAAACGAGA
TTCTCCAGTGGCTGGTGGAAACAAGCAGTGTGTACATTGAAGTGTGCAATTTGACTCAAGGAACATGCTGGGAA
CAGATGTATACTCCAGGAGGGAAAGTGAGGAATGATGATGTTGATCAAAGCTTGATATTGGCTGTAGGAACATA
GTGAGAAGAGCTGCAGTATCAGCAGATCCACTAGCATCTTTATTGGAGATGTGCCACAGCACACAGATTGGTGGAA
ATTAGGATGGTAGACATCCTTAGGCAGAACCCAACAGAAGAGCAAGCCGTGGATATATGCAAGGCTGCAATGGGA
CTGAGAATTAGTTCATCCTTCAGTTTTGGTGGATTCACATTTAAGAGAACAAGCGGATCATCAGTCAAGAGAGAG
GAAGAGGTGCTTACCGGAAATCTTCAAACATTTAAGATAAGAGTGCATGAGGGATATGAAAGAGTTCAACAATGGTT
GGGAGAAGAGCAACAGCCATACTCAGAAAAGCAACCAGGAGATTGATTGAGTGTAGTGGAGAGAGACGAA
CAGTTCGATTGCGAAGCAATAATTTGGCCATGGTATTTTCCACAAGAGGATTTGATGATAAAGAGTGCAGAGGT
GATCTGAATTTCTCAATAGGGCGAATCAGCGATGAACTCTATGCATCAACTTTTAAGACATTTTCAGAAAGAT
GCAGAGTGTCTTTTCAAATTTGGGGAGTTGAACTATCGACAAATGATGAGGAAATGATTGGGATATTGGCCGAC
ATGACTCCAAGCATCGAGATGTCAAATGAGAGGAGTGAAGATCAGCAAAAATGGGTGTAGATGAGTACTCCAGCACG
GAGAGGGTGTGGTGGACATTTGACCGTTTTTTGAGAATCCGGGACCAACGAGGAAATGTACTACTGTCTCCCGAG
GAGGTGAGTGAACACAGGGAACAGAGAACTGACAATAACTTACTCATCGTCAATGATGTGGGAGATTAATGGT
CTGAATCAGTATTGGTCAATACCTATCAATGGATCATCAGAAACTGGGAACTGTTAAAATTCAGTGGTCCCGAG
AACCTACAATGCTATACAATAAAAATGGAATTTGAACCAATTTGAGTCTTTAGTACCTAAGGCCATTAGAGGCCAA
TACAGTGGGTTTGTAAAGAACTCTGTCCAAACAATGAGGGATGTGCTTGGGACATTTGATACCGCACAGATAATA
AAACTTCTCCCTTCGACCCGCTCCACCAAAGCAAAGTAGAATGCAGTTCTCTCATTTACTGTGAAATGTGAGG
GGATCAGGAATGAGAATCTTGTAAAGGGCAATTTCTCTGTATTCAACTATAACAAGGCCACGAAGAGACTCACA
GTTCTCGGAAAGGATGCTGGCATTAACTGAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTGGAGTGGAGTCCGCTGTCTG
AGGGGATTCCTCATTTCTGGCAAAGAAGACAAGAGATATGGGCCAGCACTAAGCATCAATGAACTGAGCAACCTT
GCGAAAGGAGAGAAGGCTAATGTGCTAATTTGGGCAAGGAGACGTGGTGTGGTAATGAAACGGAACCGGACTCT
AGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAAGAAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATGATTTAAAAA
CGACCTTGTCTACT

SEQ ID NO: 12 (NP, PR8-X)

AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCAAAAATCATGGCGTCTCAAGGCCACCAACGATCTTAC
GAACAGATGGAGACTGATGGAGAACGCCAGAATGCCACTGAAATCAGAGCATCCGTCGGAAAAATGATTTGGTGA
ATTGGACGATTTCTACATCCAAATGTGCACCGAACCAAACCTCAGTGAATATGAGGGACGGTTGATCCAAAACAGC
TTAACAAATAGAGAGAATGGTGTCTCTGTCTTTGACGAAAAGGAGAAATAAATACCTTGAAGAACATCCAGTGGC
GGAAAAGATCCTAAGAAAATGGAGGACCTATATACAGGAGAGTAAACGGAAAAGTGGATGAGAGAATCATCTCT

TATGACAAAGAAGAAATAAGGCCAATCTGGCGCCAAGCTAATAATGGTGACGATGCAACGGCTGGTCTGACTCAC
 ATGATGATCTGGCATTTCCAATTTGAATGATGCAACTTATCAGAGGACAAGAGCTCTTGTTCGCACCCGGAATGGAT
 CCCAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGTTCAACTCTCCCTAGGAGGTTCTGGAGCCGAGGTGCTGCAGTCAAAGGA
 GTTGGAAACAATGGTGATGGAATTTGGTCAGAATGATCAAACGTGGGATCAAATGATCGGAACCTCTGGAGGGGTGAG
 AATGGACGAAAAACAAGAAATTTGCTTATGAAAGAATGTGCAACATTTCTCAAGGGGAATTTCAAACCTGCTGCACAA
 AAAGCAATGATGGATCAAGTGAAGAGAGCCGGAACCCAGGGAATGCTGAGTTCGAAGATCTCACTTTTCTAGCA
 CGGCTCTGCACTCATATTGAGAGGGTCCGGTTGCTCACAAGTCTGCTGCCTGCCTGTGTGTATGGACCTGCCGTA
 GCCAGTGGGTACGACTTTGAAAGGGAGGGATACTCTCTAGTCCGGAATAGACCCCTTTCAGACTGCTTCAAACAGC
 CAAGTGTACAGCTTAATCAGACCAAAATGAGAATCCAGCACACAAGAGTCAACTGGTGTGGATGGCATGCCATTCT
 GCCGATTTGAAGATCTAAGAGTATTAAGCTTCATCAAAGGGACGAAGGTGCTCCCAAGAGGGGAAGCTTTCCACT
 AGAGGAGTTCAAATTTGCTTCCAATGAAAATATGGAGACTATGGAATCAAGTACACTTGAAGTGAAGAAGCAGGTAC
 TGGGCCATAAGGACCAGAAGTGGAGGAAACACCAATCAACAGAGGGCATCTGCCGGCCAAATCAGCATACAACCT
 ACGTTCTCAGTACAGAGAAATCTCCCTTTTGACAGAACAACCAATTTAGCCAGCATTCAAATGGGAATACAGAGGGG
 AGAACATCTGACATGAGGACCAGAAATCATAAGGATGATGGAAAGTCAAGACCAAGAGATGTGTCTTTCCAGGGG
 CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAGCGAGCCGATCGTGCCCTTCTTTGACATGAGTAAATGAAGGA
 TCTTATTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTACGACAATTAAGAAAAATACCCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 13 (M, PR8-X)

AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCCGAGGTGAAACGTACGTACTCTCTATCATCCCGTC
 AGGCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGCTTTTGCAGGGAAGAACCAGGATCTTGAGGTTCT
 CATGGAAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTCTGACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTCACGCTCAC
 CGTGGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGATCCAAAATA
 CATGGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAACATTCATGGGGCCAAAGAAATCTCACT
 CAGTTATCTGCTGGTGCCTTGCAGTTGATAGGGCTCATATACAACAGGATGGGGCTGTGACCACTGAAAT
 GGCAATTTGGCTGTATGTGAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCAGCATCGGCTCATAGGCAAAATGGTGAC
 AACAAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAACAAGTGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAT
 GGCTGGATCGAGTGAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCCAGCTAGACAAATGGTGAAGCGATGAG
 AACCAATGGGACTCATCTAGCTCCAGTGTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAATAATGGCAGGCTATCAGAA
 ACGAATGGGGGTGAGATGCAACGGTTCAAGTATCCTCTCACTATTGGCCAAAATATCATTTGGAGTCTTCGACT
 TGACATTTGTGGATCTTGTCTGCTTTTTTTTCAAATGCATTTACCCTGCCTTTAAATACGGACTGAAAGGGGGC
 CTCTACGGAAAGGATGCCAAAGTCTATGAGGGAAGAATACTGAAAGGAACAGCAGAGTGTGTGGATGCTGAGC
 ATGGTCAATTTGTGACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 14 (NS, PR8-X)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGC
 ATGTCCGCAAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAAT
 CCTAAGAGGAAGGGGAGTACTCTCGGCTGGACATCAAGACAGCCACACGTTGTAAGCAAGATGGAGC
 GGATTTGAAAGAAGAAATCCGATGAGGCCTTAAAAAGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCCGCTTACCTAACATG
 ACATGACTCTTTGAGGAAATGTCAAGGGACTGGTCCATGCTCATACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTA
 TCAGAAATGGACCCAGGCGATCATGGATAAGAACAATCACTACTGAAAGCGAACCTCAGTGTGATTTTGACCGGCTGG
 AGACTCTAAATTTGCTAAGGGCTTTCAACCGAAGAGGGAGCAATTTGTTGGCGAAATTTCAACCTTGCCTTCTCTC
 CAGGACATCTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAG
 TTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAA
 AACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGTTCAGAAATTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGATGAGA
 CACAAACTGAAGATAACAGAGAAATAGTTTTGAGCAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTG
 GAGCAAGAGATAAGAATTTCTCGTTTCAGCTTATTTAGTACTAAAAAACACCCCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 15 (HA, PR8-X)

AGCAAAAGCAGGGGAAAAATAAAAAACAACCAAAATGAAGGCAACCTACTGGTCTGTTATGTGCACTTGCAGCTG
 CAGATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATACGAACAATCAACCCGACACTGTTGACACAGTACTCGAGAAGA
 ATGTGACAGTGACACACTCTGTTAAACCCTGTCGAAGACAGCCACAACGGAAAACTATGTAGATTAAGGAATAG
 CCCACTACAATTTGGGAAATGTAACATCGCCGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAAATGCGACCCACTGCTTCGAG
 TGAGATCATGGTCTTACATTTGTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAATAATGTTATCCAGGAGATTTTCATCGACT
 ATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTTGAGCTCAGTGTCACTCATTCGAAAGATTCGAAATATTTCCCAAGAAAGCTCAT
 GGCCCAACCAACAACAACCGGAGTAAACCGCAGCATGCTCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGC
 TATGGCTGACGGAGAAGGGAGGGCTCATACCCAAAGCTGAAAAATTTCTATGTGAACAAAAAGGGAAAAAGATCC
 TTGTAAGTGTGGGATTTCTACACCCGCTAACAGTAAGGAACAACAGAAATCTCATCAGAAATGAAAATGCTTATG
 TCTCTGTAGTGACTTCAAATATAACAGGAGATTTACCCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTAAAGAGATCAAG
 CTGGGAGGATGAACATTTACTGGACCTTGTAAAACCCGGAGACACAATAATTTTGGGCAAAATGGAATCTAA
 TAGCACCAATGATGCTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATCACTCAAACGCAATCAATGCAATG
 AGTGTAAACAGGAAGTGTCAAACACCCCTGGGAGCTATAAACAGCAGTCTCCCTTACCAGAATATACACCCAGTCA

CAATAGGAGAGTGCCAAAATACGTCAGGAGTGCCAAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATTCGGTCCA
 TTCAATCCAGAGGCTATTTGGAGCCATTGCCGGTTTTATTGAAGGGGGATGGACTGGAATGATAGATGGATGGT
 ATGGTTATCATCATCAGAAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAGCGGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAAACG
 GGATTACAAAACAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAAATGAACATTCAATTCACAGCTGTGGGTAAAGAAATCAACA
 AATTGAAAAAAGGATGAAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTTCTGGACATTTGGACATATAATGCAG
 AATTGTTAGTTCTACTGGAAAAATGAAAGGACTCTGGAAATCCATGACTCAAATGTGAAGAAATCTGTATGAGAAA
 TAAAAAGCCAAATTAAGAAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAAATG
 AATGCATGGAAAGTGAAGAAATGGGACTTATGATTTATCCCAAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAACAGGGAAA
 AGGTAGATGGAGTGAATTTGGAATCAATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTGCCAGTTCAC
 TGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTCAGTGCAGAATATGCA
 TCTGAGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAACCCCTTGTCTACT

SEQ ID NO: 16 (NA, PR8-X)

AGCAAAAGCAGGGGTTAAAATGAATCCAAATCAGAAAAATAAACCATTGGATCAATCTGTCTGGTAGTCGGAC
 TAATTAGCCATAATGGCAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCATTCAATTCAAACTGGAAAGTCAAA
 ACCATACGGAAATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAAAATAGCACCTGGGTAAAGGCACAACTTCAGTGA
 TATTAACCGGCAATTCATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAAGACAATAGCATAAAGAAATG
 GTTCCAAAGGAGACGTTTTTGTGATAAGAGAGCCCTTTATTTCAATGTTCTCACTTGGAAATGCAGGACCTTTTTTC
 TGACCCAAAGGTGCCCTTACTGAATGACAAGCATTCAAGTGGGACTGTAAAGGACAGAAAGCCCTTATAGGGCCPTAA
 TGAGCTGCCCTGTGCGTGAAGCTCCGTCCCGTACAATTCAGAATTTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCAT
 GTCATGATGGCATGGGC TGGCTAACAA TCAGAAATTCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTA TAAAAATACA
 ACGGCATAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAAAATATTTGAGGACACAAGAGTCTGAAATGTGCC TGTG
 TAAATGGTTCA TGT TTTACTATAATGACTGATGGCCGAGTGTAGGGCTGGCCCTCGTACAAAATTTCAAGATCG
 AAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCCTACTATGAGGAATGTTCC TGT TACCTG
 ATACCGACAAAAGTATGATGTGTGTGTCAGAGACAAATGGCATGGTTCGAACCGGCCATGGGTGTCTTTCGATCAAA
 ACCTGGATTATCAAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTTTTGGGTGACAACCCGCGTCCCGAAGATGGAACAGGCA
 GC TGTGGTCCAGTGTATGTTGATGGAGCAAAACGGAGTAAAGGGATTTTCATATAGGTATGGTAATGGTGT TGG
 TAGGAAGGACCAAAAAGTCAAGTTCAGACATGGGTTGAGATGATTTGGGATCC TAATGGATGGACAGAGACTG
 ATAGTAAGTCTCTGTGAGGCAAGATGTTGTGGCAATGACTGATTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAAC
 ATCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCGTCTCTGGGTTGAAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAA
 AAACAATCTGGACTAGTGCAGAGCAGCATTTCTTTTTGTGGCGTGAATAGTACTGTAGATTGGTCTTGGCCAG
 ACGGTGCTGAGTTGCCATTTCAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACTCCTTGTCTACT

SEQ ID NO: 17 (PA, 105p30)

AGCGAAAGCAGGACTGATTCGAAATGGAAGATTTGTGCGACAATGCTTCAATCOGATGATTGTGAGCTTGGC
 GAAAAGGCAATGAAAGAGTATGGAGAGGACCTGAAAATCGAAACAAACAAAATTTGCAGCAATATGCACCCACTTG
 GAAGTATGCTTCATGTATTTCAGATTTTCATTTCAATCAATGAGCAAGGCGAATCAATAATAGTAGACCTGAGGAC
 CCAAAATGCACCTTTTAAAACACAGATTTGAGATAATAGAGGGGCGAGATCGTACAATGGCATGGACAGTTGTAAAC
 AGTATTTGCAACACCACAGGAGCTGAGAAACCAAGTTTCTGCCAGATCTGTATGATTACAAGAGAATAGGTTTC
 ATCGAAATGGAGTGACAGGAGAGAAGTTCACATATACTATCTGGAAAAGGCCAACAAAATTAATCTGAGAAG
 ACACATATTACATTTTCTCATTACTGGCGAAGAAAATGGCCACAAGGCCGATTACACTCTCGTCAAGAAAAG
 AGGGCTAGAAATTA AACCCAGACTATTACCATAAGGCAAGAAAATGGCAAGCAGAGGCTTTTGGGACTCCTTTCTGT
 CAGTCCGAAAAGAGGCGAAGAGACAATTTGAAGAAAGTTTGAATTCACAGGGACAATGCGCAGGCTCGCTGATCAA
 AGCCTTCCGCCGAACTTCTCTGCATTGAGAAATTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGAAACCGAACGGCTACATT
 GAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTAAATGCTAAAATTTGAGCCTTTTTTGA AAAACAACCTCGACCA
 ATTAGACTTCCGAATGGGCTCCTTGT TTTTACGCGGTCAAAAATTCCTGCTGATGGATCTTTAAAAATTAAGCATT
 GAGGATCCAAATCATGAAGGGGAGGGAAATACCATAATATGATGCAATCAAGTGTATGAGAACAATCTTTGGATGG
 AAAGAACCACCTGTTGTCAAGCCACACGAGAAGGGAATAAATCCGAATTA TCTGCTGCTGGAAGCAGGTTGTG
 GAAGAGCTGCAGGACATGAGAGTGAAGGAGAAGATTTCCAAGAACA AAAAACAATGAAAAAAGCAGTCAAGTAAAG
 TGGGCAC TTTGGTGAAGAACA TGGCACCAAGAGAAAGTGGATTTTGTGACTGTAAAGATATAAGCGAATTTGAAGCAA
 TATGATAGTGACGAACCTGAATTAAGGTCATTTTCAAGTTGGATCCAGAAATGAGTTCAACAAGGCATGCGAGCTG
 ACCGATTCAAATCTGGATAGAGCTCGATGAGATGGAGAAGATGTGGCCCGATTGAAACACATTGC AAGCATGAGA
 AGAAATTAATTCACAGCTGAGGTGTCCCATTCAGAGGCCACTGAATATATAATGAAAGGGGTATACATTAATACT
 GCTTTGCTTAAATGCATCCTGTGCAGCAATGGATGATTTCCAATAATTCCTATGATAAGCAAAATGTAGAACAATA
 GAGGGAAGGAGAAAGACCAATTTGTACGGCTTCAATCATAAAAAGGAAGATCTCACTTAAGGAATGATACCGATGTG
 GTAAACTTTGTGAGCATGGAGTTTCCCTCACTGACCCAAAGACTTGAGCCACACAAAATGGGAGAAGTACTGTGTT
 CTTGAGATAGGAGATATGCTTCTAAGGAGTGCATAGGCCAAGTGTCAAGGCCCATGTTCTTGTATGTAAGAAACA
 AATGGAACCTCAAAAATTA AAATGAAAATGGGGAATGGAGATGAGGCGTTGCCCTCCCAATCCCTCAACAAATA
 GAGAGCATGATTGAAGCTGAGTCTCTGTCAAGGAGAAAGACATGACAAAAGAGTTTTTGGAGAAATAGATCAGAA
 ACATGGCCCATTTGGAGAGTCAACAAAAGGAGTGGAAAGAGTTCCATTGGGAAAGTATGCAGGACACTATTGGCT
 AAATCAGTATTCATAGTCTGTATGCATCTCCACAATTAAGAAGGATTTTCAGCTGAGTCAAGAAAGTGTGCTCTT

ATTGTTTCAGGCTCTTAGGGACAATCTGGAACTGGGACCTTTGATCTTGGGGGACTATATGAAGCAATTGAGGAG
 TGCCGTGATTAATGATCCCTGGGTTTGCCTAATGCTCTTGGTTCAACTCCTTCTAAAACATGCATTGAGATAG
 CTGAGGCAATGCTACTATTTGTTATCCATACTGTCCAAAAAAGTA

SEQ ID NO: 18 (PBI, 105p30)

AGCGAAAGCAGGCCAAACCATTTGAAATGGATGTCAATCCGACATTACTTTTCTTAAAAGTGCCAGCACAAAATGCT
 ATAAGCACAACTTTTCTTATACTGGTGACCCCTCCTTACAGCCATGGAACAGGAACAGGATACACCATGGATACA
 GTCACAGGACACATCAGTACTCAGAAAAGAGGAAGATGGACGAAAAATACCGAACTGGAGCACCCGCAACTCAAC
 CCAATTGATGGGCCACTACCAGAAGACAATGAACCAAGTGGCTATGCCCAAACAGATTGTGTATTAGAGGCAATG
 GCTTTCCTTGAAGAATCCCATCCGGTATTTTGA AAACTCTGTATTGAAACAAATGGAGGTTGTTTCAGCAAACA
 AGGGTGGACAAACTGACACAAGGCAGACAAAACCTATGACTGGACTCTAATAGGAACAGCCTGCTGCCACAGCA
 TTGGCAAACACCATAGAAGTATTAGATCAAAATGGCCCTCATAGCAAATGAATCTGGAAGGCTAATAGACTTCC TT
 AAAGATGTAATGGAGTCGATGGACAGAGACGAAGTAGAGGTCACAACTCATTTTCAAAGAAAAGAGGAGAGTGAGA
 GACAAATGTAACATAAAAAATGGTGACCCAAAGAAACAATAGGAAAAAGAAACATAAATAGACAAAAGAAAGTTAC
 CTAATTAGGGCATTAAACCTGAACACAATGACCAAGATGCTGAGAGGGGGAAACTAAAACGCAGAGCAATGCA
 ACCCCAGGAATGCAAAATAGGGGGTTTGTATACCTTTGTTGAGACACTGGCAAGAAGCATATGTGAAAAGCTTGAA
 CAATCAGGGTTGCCAGTTGGAGGAAATGAGAAGAAAAGCAAAAGTTAGCAAATGTTGTAAGGAAGATGATGACCAAC
 TCCCAGGACACTGAAATTTCTTTTACCATCACTGGAGATAACACAAAAATGGAAACGAAAAATCAAACCCCTAGAAATG
 TTCCTGGCCATGATCACATATATAACCAAGAATCAGCCCTGAAATGGTTTCAGAAATATCTTAAATGTTGCTCCAA TA
 ATGTTTCAAACAAAATGGCGAGACTAGGTAGGGGTATATGTTTGAAGCAAGAGATGTAAGAAACCCCA
 ATACCTGCAGAGATGCTAGCCAACATAGATTTGAAATATTTCAATGATTAACATAAAAAGAAAATGAAAAAATTT
 CGACCATTATTAATAGATGGAACGCATCAATGAGTCCGGAAATGATGATGGGCATGTTCAATATGTTAAGCACC
 GTCCTGGGCGTTTCCATTCTGAATCTTGGGCAAAAAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGTCTTCAA
 TCGTCTGATGATTTGCTTTGATGTGAATGCACCCAATTTATGCAGGAATCAAGCTGGAGTTGACAGGTTTAT
 CGAACCTGTAAGCTGCTCGGAATTAATATGAGCAAAAAGAAAGTCTTACATAAACAGAACAGGTACCTTTGAATTC
 ACGAGCTTTTCTATCGTTATGGGTTGTTGCCAATTTGAGCATGGAGCTTCCTAGTTTTGGGGTGTCTGGGGTCT
 AATGAATCTGCAGACATGATGATTTGGAGTCACTGTCAATCAAAAACAATATGATAAACAAATGACCTTGGCCAGCA
 ACTGCTCAAATGGCCCTTCAGTTATTTATAAAAGATTACAGGTACACTTATCGATGCCAGACACACACTTTGGGTC
 ATACAAAACCCGGAGATCATTTGAAATAAAGAAACTATGGGACCAAAACCCGCTCCAAAGCTGGGCTGTTGGTCTCT
 GATGGAGGCCCAATTTATATAACAATTAGGAATCTACATATTCCTGAAGTCTGCTTGAATGGGAGTTGATGGAT
 GAGGATTACCAGGGGGCTTTATGCAACCCATTGAACCCGTTTGTGAGCCATAAAGAGATTGAATCAGTGAACAAT
 GCAGTGATAATGCCGGCACATGGTCCAGCCAAAATATGGAGTATGACCTGTGTGCAACACACACTCTTTGGGTC
 CCCAAAAGAAAATCGATCCATTTTAAACACGAGCCAAAAGAGGGATACCTTGAAGATGAGCAAAATGTACAAAGGTGC
 TGCATTTATTTGAAAAATCTTCCCAAGTAGCTCATACAGAAGACCAGTTGGAAATATCCAGTATGGTAGAGGCT
 ATGGTTTCAAAGAGCCCAATTTGATGCACGGATTGATTTGGAATCTGGAAGGATAAAGAAAAGAGGAATTCGCTGAG
 ATCATGAAGACCTGTCCACCATGAAGACCTCAGACGGCAAAAATAGGGAATTTGGCTTGTCTTTCATGAAAAA
 ATGCCTTGTCTACT

SEQ ID NO: 19 (PB2, 105p30)

AGCGAAAGCAGGTCATTAATTTCAATATGGAAGAATAAAAAGGCTAAGGAATCTGATGTCACAATCTCGCACT
 CGCGAGATACTTACCAAACACTCTGTAGACCACATGGCCATAATAAAGAAATACACATCAGGAAGACAGGAGAAA
 AACCCATCACTTAGGATGAAATGGATGATGGCAATGAAATACCCAATTTACAGCTGATAAAAAGGATAACGGAAATG
 ATTCTGAAAGAAATGAGCAAGGACAGACACTATGGAGTAAAGTGAATGATGCCGGATCAGACCCGAGTATGATA
 TCACCCCTAGCTGTGACATGGTGGAAACAGAAATGGACCAGTGGCAAACACTATCCACTATCCAAAAATCTACAAA
 ACTTACTTTGAAAAGGTTGAAAAGGTTAAAACAATGGAACCTTTGGCCCTGTACACTTTAGAAAACCAAGTCAAAA TA
 CGCCGAAGAGTTCACATAAATCCCTGGTCAATGCAGACCTCAGCGCAAGGAGGCACAGGATGTAATTTATGGAAGTT
 GTTTTCCCTAATGAAGTGGGAGCCAGAACTAACAATCAGAAATCGCAATTAACGATAACTAAGGAGAAAAAAGAG
 GAATCCAGAATTGCAAAATTTCCCTTTGATGGTTGCATACATGTTAGAGAGGGAACTTGTCCGCAAAACAAGA
 TTTCTCCCGGTTGCAGGTGGAACAAGCAGTGTGTACATTGAAGTTTGCATTTAACACAGGGGACATGCTGGGAG
 CAGATGTACACTCCAGGTGGGAGGTGAGGAATGATGATGTTGATCAAAGCCTAATTAATGCTGCTAGGAACATA
 GTGAGAAGAGCTGCAGTATCAGCAGATCCACTAGCATCTTTATTAGAAATGTGCCATAGCACACAGATTTGGTGGAA
 ACAAGGATGGTGGATATTTCTCAGGCAAAATCCAACAGAAGAACAAGCTGTGGACATA TGCAAAGCAGCAATGGGG
 CTGAGAATCAGTTTCACTCCTCAGTTTGGCGGATTCAACATTTAAGAGAACAAGTGGATCGTCACTCAAAGGGGAG
 GAAGAAGTCTAACGGGCAATCTGCAAAACATTGAAGCTAACTGTGCATGAGGGATATGAAGAATTCACAAATAGTT
 GGGAAAAAGGCAACAGCTATACTCAGAAAAGCAACCAGGAGATTGATTCAACTAATAGTGAAGTGAAGAGACGAA
 CAGTCAATAGTCAAGCAATAGTTGTAGCAATGTTATTTCTCACAAGAAGATTGCATGGTAAAAGCGGTTAGAGGT
 GACTGAAATTTGTTAAATAGAGCGAATCAGCGGTTGAAATCCCATGCATCAACTTTTGAAGACATTTTCAAGAAAGGAT
 GCTAAAGTACTTTTCTAAATTTGGGAAATGAACATATTGACAAATGTGATGGGAATGATTTGGGATATTACCTGAT
 ATGACTCCAAGTACCAGATGTCAATGAGAGGAGTGAAGTGCAGCAAAATGGGTGTAGATGAATACTCCAATGCT
 GAAAGGGTAGTGGTAAGCATTGACCGTTTTTTGAGGGTCCGGGACCAAGAGGAAATGTATTACTGTCTCCAGAG
 GAAGTCAAGTGAACAACAAGGAACAGAGAACTGCAATAAATTAATCTTCAATCATTGATGGGAGATTAATGGC

CCTGAGTCAGTGTGATCAATACCTACCAATGGATCATCAGAACTGGGAGACTGTTAAAATTCAGTGGTCTCAG
 AACCCACAAATGCTATACAATAAAATGGAATTTGAGCCATTTCAATCTCTAGTCCCAAGGCCATTAGAGGCCAA
 TACAGTGGGTTTGTAGAACTCTATTTCAACAAAAGAGGGATGTGCTCGGGACCTTTGACACAACCTCAGATAATA
 AAACCTCTTCCCTTTGCAGCCGCTCCACCAAAGCAAAGTAGAATGCAATTCCTCGTCAATTAAGTGTGAATGTGAGG
 GGATCAGGAATGAGAATACTTGTAAAGGGTAATTCCTCAGTATTCAACTACAACAAGACCCTAAGAGACTCACA
 ATCCTCGAAAGGATGCTGGCACTTTAAGTGAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTGGAGTGGAAATCTGCTGTTTTA
 AGGGGATTCCTCATTCTAGGCAAAGAAGTAGAAGATATGGGCCAGCATTAAAGCATCAGTGAATGTAGCAACCTT
 CGCAAAGGGGAGAAAGCTAATGTGCTAATTTGGGCAAGGGGATGTAGTGTGGTAAATGAAACGAAAACGGGACTCT
 AGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAATTTGAAATAATTTAAAAA
 CGACCTTGTCTTACT

SEQ ID NO: 20 (NP, 105p30)

AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGCATCAAAGTCATGGCGTCCCAAGGCACCAAACGGTCTTAC
 GAACAGATGGAGACTGATGGGGAACGCCAGAATGCAACTGAAATCAGAGCATCCGTCGGAAGAAATGATTGGGGGA
 ATTGGGCGATTCTACATCCAAATGTGCACCGAGCTTAAGCTCAATGATTATGAGGGACGACTGATCCAGAACAGC
 TTAACAAATAGAGAGAATGTTGCTTTCTGCTTTTGTATGAGAGGAGAAATAAATATCTGGAAGAATCCAGCGCA
 GGGAAAGATCTTAAGAAAACCTGGAGGACCCATATACAAGAGAGTAGATGGAAGTGGGTGAGGGAACTCGTCTTT
 ATGACAAAAGAAATAAGGCGGATTTGGCGCAAGCCAAACAATGGTGTATGCAACAGCTGGTTGACTCAC
 ATATATGATCTGGCATCTAATTTGAATGATACAACCTTACCAGAGGACAAGAGCTCTTGTCCGCAACGGAAATGGAT
 CCCAGGATGTGCTCTTTGATGCAAGGTTCAACTCTCCCTAGAAGATCTGGAGCAGCAGGCGCTGCAGTCAAAGGA
 GTTGGGACAATGGTATTGGAGTTAATCAGGATGATCAAACCTGGGATCAACGACCCGAAACTTCTGGAGGGGTGAG
 AATGGGAGAAAAACAAGGATGCTTATGAGAGAAATGTGCAACATTCCAAAGGAAAAATTCAAACAGCTGCACAA
 AAAGCAATGATGGATCAAGTGAAGAGAAAGCCGGAACCCAGGAAATGCTGAGATCGAAGATCTCACTTTTCTGGCA
 CGGTCTGCACTCATATTGAGAGGATCAGTTGCTCACAAGTCTTGCCCTGCTGCTTGTGTGATGGACCAGCCGTA
 GCCAGTGGGTATGACTTCGAAAAAGAGGGATACTCTTTGGTGGGAGTAGACCTTTCAAACCTGCTTCAAACAGT
 CAGGTATACAGCCTAATTAGACCAACAGGAAATCCCGCACACAAGAGCCAGTTGGTGTGGATGGCATGCAATTTCT
 GCTGCATTTGAAGATCTAAGAGTGTCAAGCTTCACTCAGAGGGACAAGAGTACTTCCAAGGGGAAAGCTCTCCACT
 AGAGGAGTACAAAATGCTTCAAATGAAAACATGGATGCTATTGCTCAAGTACTCTTGAAGTGAAGAGCAGATAC
 TGGGCCATAAAGAACAGAGTGGAGGGAAACCAATCAACAAAGGGCTCTGCGGGCCAAATCAGCACACAACCT
 ACGTTTTCTGTGCAGAGAACTCCCATTTGACAAAACAACCATCATGGCAGCATTCACTGGGAAATACAGAGGGA
 AGAACATCAGACATGCGGGCAGAAATCATAAAGATGATGGAAAGTGAAGACCAGAAGAAGTGTCTTCCAGGGA
 CGGGGAGTCTTTGAGTCTCGGACGAAAGGGCAACGAACCCGATCGTGCCTCTCTTTGACATGAGTAAATGAAGGA
 TCTTATTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTACGACAATTAATGAAAAATACCCTTGTCTTACT

SEQ ID NO: 21 (M, 105p30)

AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCGTCCCATC
 AGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGATTTTGTGGAAGAAATACCAGTCTTGAGGCTCT
 CATGGAAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACAGCTCAC
 CGTGGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAATGGGGATCCAAATAA
 TATGGACAAGGCTGTCAAACCTGTATCGAAAGCTTAAAGAGGGAGATAACATTCATGGGGCCAAAGAAATAGCACT
 CAGTTATCTGCTGGAGCACTTGCCAGTTGTATGGGACTCATATACAAACAGGATGGGGCTGTGACCACCGAATC
 AGCATTGGCCTTATATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCCGACTCCAGCATAAGTCTCATAGGCAAAATGGTAAC
 AACAAACCAATCCATTAATAAGACATGAGAACAGAAATGGTTCTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAAAT
 GGCTGGATCGATGAAACAGCAGCTGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCCAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAG
 AGCCATTGGGACTCATCCTAGCTCTAGCACTGGTCTGAAAAATGATCTCCTTGAAAAATTTGCAGGCTATCAGAA
 ACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAGTGTATCCTCTTGTGTTGGCCGCAAGTAAATGGGATTTGTGCACC
 TGATATTGTGGATTATTGATCGCTTTTTTCCAAAAGCATTATCGTATTTTTAAACACGGTTTTAAAAAGAGGGC
 CTCTACGGAAGGAGTACCGGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAGAGGAAACAGCAGAAATGCTGTGGATGCTGACC
 ATGGTCAATTTGTGACATAGAGCTAGAGTAAAAACTACCTTGTCTTACT

SEQ ID NO: 22 (NS, 105p30)

AGCAAAAGCAGGGTGGCAAGACATAATGGATTCACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGATTGTTTCCTTTGGC
 ATGTCGCCAAAACAAGTTGCAGACCAAGATCTAGGGGATGCCOCTTCTTGTATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGT
 CTCTAAAGGGACGAGGCAACACTCTCGGTCTGAACATCGAAACAGCCACTTGTGTTGGAAAGCAAATAGTAGAGA
 GGATTTCTGAAAAGAAATCCGATGAGACATTTAGAATGACCATGGCCCTCCGCACTTGTCTCGCGGTACCTAACTG
 ACATGACTGTTGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAAAGTGGCTGGCCCTCTTTGTG
 TCAGAATGGACAGGCGATAATGGATAAAGAACATCATACTGAAAGCGAACTTCAGTGTGATTTTTGACCAGGTTGG
 AGAATCTGACATTAATAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTTGTTGGCGAAATTTCAACCTATGCTCTTTCT
 CAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTTGGGGTCTCCTCGGGGACTTGAATGGAATGATAACACAG
 TTCGAGTCTCTGAAGCTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGACTGGGGGACCTCCATTCACACAA
 CACAGAAACGGAAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAAGTGAGG

CATAAATTGAAGACGACAGAGAGTAGTTTTGAACAAATAACATTATGCAAGCATTACAGCTATTGTTTGAAGTG
GAACAAGAGATTAGAAGCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAAAAACACCCCTTGTTCCTACT

SEQ ID NO: 23 (HA, 105p30)

AGCGAAAGCAGGGGAAAAATAAAGCAACCAAAATGAAAGTAAACTACTGGTCTGTTATGTACATTTACAGCTA
CATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACACTCAACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGA
ATGTAACAGTGCACACTCTGTCAACCTACTTTGAGGACAGTCACAATGGAAAATGTTCTACTAAAAGGAATAG
CCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAAATGCGAATTAAGTATCCCA
AGGAATCATGGTCTACATTGTAGAAACACCAAACTCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGTATTTCCGCGACT
ATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTTCAAGTATCTTCATTTGAAAGGTTGCGAAATATCCCCAAAGAGAGCTCAT
GGCCCAACCAACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAACGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGC
TATGGCTGACGGGGAAGAAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCTTATGCAAAACAACAAAGAGAAAAGAAAGTCC
TTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAATACATAGGGGACCAAGGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATG
TCTCTGTAGTGTCTTACATTTATAGCAGAAGATTCAACCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGGTGAGAGACCCAGG
AAGGAAGAACTCACTACTTGGACTCTGCTGGAACCCGGGGATACAATAATTTGAGGCAAAATGGAATCTAA
TAGCCCAAGGTATGCTTTCCGACTGAGTAGAGGCTTGGGATCAGGAATCATCACTCAAATGCAACCAAGTAAAG
AATGTGATGCAAAAGTGTCAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCCTTCCAGAAATGTACACCCAGTCA
CAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTGAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCA
TTCAATCCAGAGGTTTGGTTGGAGCAATGGCCGTTTCATTTGAAAGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTGGT
ATGGTTATCATCATCAGAAATGAGCAAGGATCTGGGTATGCTGCAGATCAAAAAAGCAACAAAAATGCCAATTAACG
GGATTACAAACAAGGTGAATTCGTAAATGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAAAGAAATCAACA
AATTTGAAAAGAAAGGATGGAACCTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACATTTGGACCATAAATGCAG
AATTTGTTGGTTCTACTGGAATAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAACTGAAAGAAATCTGTATGAGAAAAG
TAAAAAGCCAAATTAAGAAATAATGCCAAAGAAATAGGAAAAGGGTGTGTTTGAATTCATCACAAAGTGAACGATG
AATGCATGAGAGTGTGAAAAATGGAACCTTATGACTATCCAAAATATCCGAAGAAATCAAAGTTAAAACAGAGAGA
AAATTTGATGGAGTGAATTTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCCCGAGTCCC
TGGTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAAGTGTAGAATATGCA
CTAAGACCAGAATTCAGAAAATAAAGGAAAAACACCCCTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 24 (NA, 105p30)

AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAATCAAAAAATAATAACCATTGGATCAATCAGTATAGCAATCGGAA
TAATTAGTCTAATGTTGCAAAATAGGAAATATTATTTCAATATGGGCTAGTCACTCAATCCAAACTGGAAGTCAAA
ACCACACTGGAAATATGCCAACCAAAAAATCATCAGATATGAAAACAGCACCTGGGTGAATCACACATATGTTAATA
TTAACAACTAATGTTGTTGCTGGAAAGGACAAAACCTCAGTGACACTGGCCGGCAATTCATCTCTTTGTCCATA
TCAGTGGATGGGCTATATACACAAAAGACAACAGCATAAGAATTTGGCTCCAAAGGAGATGTTTTTGTATAGAG
AACCTTTCATATCATGTTCTCACTTTGGAATGCAGAACCTTTTTTCTGACCAAGGTGCTCTATTAATGACAAAAC
ATTCAAATGGAACCGTTAAGGACAGAAAGTCCCTTATAGGGCTTAATGAGCTGTCCCTTAGGTGAAGCCCGCTCAC
CATACAATTCAAAGTTTGAATCAGTTGCAATGGTCAAGCGCATGCCATGATGGCAAGGGCTGGTTAAACAATCG
GAATTTCTGGTCCAGACAAATGGAGCTGTGGCTGTACTAAAATACAAACGGAAATAAATGAAACCAATAAAAAGTT
GGGAAAAGCGAATATTGAGAACAACAAGAGTCTGAATGTGTTTGTGTAACGGGTGATGTTTCAACATAATGACCG
ATGGCCCGAGTAATGGGCGCCCTCGTACAAAATCTTCAAGATCGAAAAGGGGAAAGGTTACTAAAACAACAGAGT
TGAATGCACCCAAATTTTCAATATGAGGAATGTTCTGTTACCCAGACACTGGCACAGTGTGTGTATGCAGGG
ACAACCTGGCATGGTTCAAATCGACCTTGGGTATCTTTTAAATCAAAAATGGAATTAATAATAGGATACATCTGCA
GTGGAGTGTTCGGTGACAAATCCGCGTCCCAAAGTGGGAAGGGCAGCTGTAATCCAGTACTGTTGATGGAGCAG
ACGGAGTTAAGGGGTTTTCATACAAATATGGTAAATGGTGTGTTGGATAGGAAGGACTAAAAGTAAACAGACTTAGAA
AGGGGTTTGGAGATGATTGGGATCCATAATGGATGGACAGATACCAGCAGTGAATTTCTCAGTGAACAGGATGTTG
TGGCAATAACTGATTGGTCAGGGTACAGCGGAAGTTTCGTCCAACATCTGAGTTAACAGGATTTGACTGTATAA
GACCTTGCTTCTGGGTTGAGTTAGTCAAGAGGACTGCCTAGAGAAAATACAACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGCA
TTTCTTTTGTGGCGTTGATAGTGACTGCAAAATGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCGTTCAACATTG
ACAAGTAGCTCGTTGAAAAAACTCCTTGTTCCTACT

SEQ ID NO: 25 (HA, A/Chile/1/1983)

MKAKLLVLLCALSATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDNHNKLC/KLKGIAPLQLGKCS IA
GWILGNPECESLFSKKSWSYIAETPNSENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPKNHVTKGVT
AACSHKGS SFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPNIEDQKTIYRKENAYVSVSSHYNR
RFTPEIAKRPKVRNQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDKACQTFQ
GAINSSLFPQNVHPVTIGCEPKYVRSTKLRMVTGLRNI PS IQSRLFLGAIAGFIEGGWTGMIDGWYHYHQQEQQ
SGYAADQKSTQNAINGITNKVNS I IEKMTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWYNAELLVLENER
TLDHFDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEI GNGCFEYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESM
GVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 26 (NA, A/Chile/1/1983)

MNPNQKIITIGSICMTIGIISLILQIGNIISIWVSHSIQTGSONHTGICNQRITTYENSTWVNTQYVNIHNTNVV
 AGKDTTSTVLGNSSSLCPVIRGWAIIYKDNISIRIGSKGDVVFVIREPFISSCSHLECRFFLTQGALLNDKHSNGTIVK
 DRSPYRALMSPCIPEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGMWLTIGISGPDGAVAVLKYNGIITETIKSWRKRILR
 TQSEECVINGSCFTIMTDGSPNGPASYRIFKIEKGIKTKSIELDAPNSHYEECSYPTGTVMCVCRDNWHGNS
 RPWVSNQNLQDYQIGYICSGVFGDNPRPKDGKSCDPVTVDGADGVKGFYSRYGNVWIGRTKSNSSRKGFMIV
 DPNGWTDSDNLFVQDVMVMTDWSGYSFVQHPPELTGLDCMRPCFWVELVVRGRPREGTTVWTSGSSISFCGVN
 SDTANWSWPDGAELPFTIDK

SEQ ID NO: 27 (NA, A/California/04/09)

MNPNQKIITIGSVCMITIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNIETCNQSVITYENNTWVNTQYVNIHNTNFA
 AGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYKDNISVIRIGSKGDVVFVIREPFISSCSPLECRFFLTQGALLNDKHSNGTIVK
 DRSPYRILMSPCIPEVPSYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNILR
 TQSEECACVINGSCFTVMTDGPNSGQASYRIFRIFKIEKGIKTKSIVEMNAPNYHYEECSYPTDSEITCVCRDNWHGNS
 RPWVSNQNLQDYQIGYICSGIFGDNPRPKDKTGSVSSNGANGVKGFYSKYGNVWIGRTKSISSRNGFMIV
 DPNGWTDSDNLFVQDVMVMTDWSGYSFVQHPPELTGLDCIRPCFWVELVVRGRPREGTTVWTSGSSISFCGVNS
 DTVGWSWPDGAELPFTIDK

SEQ ID NO: 28 (encodes the same amino acid sequence as SEQ ID NO: 3)

ATGGAACGCATTAAAGAAGCTGCGCAACCTGATGAGCCAGAGCCGCCACCCGCGAAAATCTGACCAAAACCACCGTG
 GATCATATGGCCGATTATTAATAAAATATACCCAGCGCCGCCAGGAAAAAACCAGCCCTGCGCATGAAATGGATG
 ATGGCCGATGAAATATCCGATTACCCGCGATAAAAGCATTACCGAAATGATTCGGAAACGCAACGAACAGGGCCAG
 ACCCTGTGGAGCAAAAGTGAACGATGCGGGCAGCGATCGCGTGATGATTAGCCCGCTGGCCGGTGACCTGGTGGAAAC
 CGCAACGGCCCGGTGGCGAGCACCATTCTATATCCGAAAATTTATAAAACCTATTTTGAAGAAAGTGGAAACGCGCTG
 AAACATGGCACCTTTGGCCCGGTGCATTTTCGCAACACAGGTGAAAATTCGCGCCCGCGTGGATATTAACCCGGGC
 CATGCCGATCTGAGCCGGAAGAAGCGCAGGATGTGATTATGGAAGTGGTGTTCGGAACGAAGTGGCGCGCCGC
 ATTCTGACCAGCGAAAGCCAGCTGACCATTACCAAGAAAAAAGAAGAACTGCAGAACTGCAAAATAGCCCG
 CTGATGGTGGCGTATATGCTGGAACCGCAACTGGTGCAGCAAAACCCGCTTTCTGCGCGTGGCGGGCGCCACCAAGC
 AGCGTGTATATGGAAGTGTGCATCTGACCAGGGCACCTGCTGGGAACAGATGTATACCCGGGCGCGGAAGT
 CGCAACGATGATGTGGATCAGAGCCTGATTATTGCGGGCGCAACATTGTGCGCGCGCGGGCGGTGAGCGCGGAT
 CCGCTGGCGAGCCTGTGGAATGTCCATAGCACCCAGATTGGCGGCACCCGCAATGGTGGATATCTGCGCCAG
 AACCCGACCGAAGAAGCCGCGGTGGATATTTGCAAGCGGGGATGGGCCTGCGCATTAGCAGCAGCTTTAGCTTT
 GGCGGCTTTACCTTTAAACGCACCAAGCGGCGCAGCGTGAACCGCGAAGAAGAGTGTGACCCGCAACCTGCAG
 ACCCTGAAACTGACCGTGCATGAAGCTATGAAGAATTTACCATGGTGGGCAACCGCGACCCGCGATTCTGCGC
 AAAGCGACCCCGCGCTGATTACAGTGTATTGTGAGCGCGCCGATGAACAGAGCATTGTGGAAGCGATTGTGGTG
 GCGATGGTGTAGCCAGSAGATTGCATGGTGAAGCGGTGCGCGCGGATCTGAACTTTGTGAACCGCGCAAC
 CAGCGCTGAAACCGATGCATCAGCTGCTGCGCATTTCAGAAAAGTGCAGAAAGTGTGTTCTGAACTGGGAC
 ATGGAACCGATTGATAACGTGATGGCATGATTGGCATTCTGCGCGATATGACCCGAGCACCAGAAATGAGCATG
 CGCGCGGTGCGCGTGAAGAAATGGCGTGGATGAATATAGCAACCGGAAACCGCGTGGTGGTGAACATTGATCGC
 TTTCTGCGCGTGCAGCATCAGCGCGCAACGCTGCTGCTGAGCCCGAAGAAGTGAAGCAACCCAGGGCACCGAA
 AAATGACCATTACCTATAGCAGCAGCATGATGTGGGAAATTAACGGCCCGAAGCGTGTGATTAACACCTAT
 CAGTGGATTATTCGCAACTGGGAAACCGTGAAATTCAGTGGAGCCAGAACCCGACCATGCTGTATAACAAAAATG
 GAATTTGAACCGTTTCAGAGCCTGGTGCCGAAAGCGATTCCGCGCCAGTATAGCGGCTTTGTGCGCACCTGTT
 CAGCAGATGCGCGATGTGCTGGGCACTTTGATACCAACCCAGATTATTAACCTGCTGCGGTTTTCGCGCGCGCG
 CCGAAACAGAGCCGATGCAGTTTAGCAGCCTGACCGTGAACGTGCGCGGAGCGGCATGCGCATCTTGGTGC
 GGCAACAGCCCGGTGTTAACTATAACAAAACCAACCGCTGACCGTGTGGGCAAGATGCGGGCACCCCTG
 ACCGAAGATCCGGATGAAGGCACCGCGGGCGTGGAAAGCGCGGTGCTGCGCGGCTTTCTGATTCTGGGCAAGAA
 GATCGCGCTATGGCCCGCGCTGAGCATTAAAGCACTGAGCAACCTGGCGAAAGCGGAAAGCGAACCTGCTG
 ATGGCCAGGGCGATGTGGTGTGATGAAACGCAACCGGATAGCAGCATTCTGACCGATAGCCAGACCGCG
 ACCAAACGCATTTCGATGGCGATTAAC

SEQ ID NO: 29 (PA, A/New Caledonia/20/1999)

medfvrqcfnpmivelaekamkeygedpkietnkfaaictlhevcmysdfhfidergesilivesgdpnallkhr
 feiiegrdrimawtvvnsicnttgvekpflpdlydykenrfieigvtrrevhiyylekankiksekthihifsf
 tgeematkadytldeesrariakrlftirqemasrslwdsfrqsergeetieekfeitgtmrkladqslppnfp
 lenfrayvdgfepongiciegklsqmskevnakieplrttprlrlpdgplchqrskflldalklsiedpsheg
 giplydaikcmkttffgwkepnivkpkhekginpnymawkqvlaelqdieneekiprtknmkrtsqlkwalgenma
 pekvdfdcdkvdgdlkqydsdepeprslaswvqnefnkaceldsswieldeigedvaplehiasmrnyftaev
 shcrateyimkgyvintallnascaamddfqlipmiskrctkegrkrktnlygfiiikgrshlrndtdvvnfvsmef
 sltdprlephkwekyvleiqdmlrltaigqvarpmlflyvrtngtskikmkwgemrcllqslqqiesmieaes

svkekdmteffenksetwpigesprgveesigkvcrtllaksvfnslyaspqllegfsaesrklillivqalrdrn
lepgtfdlqglyeaieeclindpwwllnaswfnslthalk

SEQ ID NO: 30 (PBI, A/New Caledonia/20/1999)

mdvnp1llflkvpqnaisttftpytdqppyshtgtgymtdvnrthqysergrwtktntetgapqlnpidgplpk
dnepsgyaqtdcvleamafleeshpgifenscietmevvqgtrvdkltqgrqtdydwlnrnqpaatalantievf
rsglianegsgrlidflkdvmesmdrdevvtthfgrkrvrdnvtkkmvtqrtigkklkklkdkrsyliraltln
tmtkdaergklkrraiaatpgmqirgfvfyvetlarsicekleqsglvpvggnekkaKlanvvrkmtnsqgdeisf
titgdntkwnenqnrpmflamityitkngpewfrnilsiapimfnskmarlgkqymfesksmklrtqipaemlan
idlkyfndstkrkiekirpllidqtaslsppqmmgmfnmlstvlvgvsiilngqkrytkktyywdqlgssddfali
vnapnyagiqagvdrfyrtckllginmskkksyinrtgtfestsffryygfvanfsmelpsfgvsgvnesadmsi
qvtviknminndlgpataqmalqlfikdyrytyrchrqdtqigttrrsfeikklwdqtrskagllvsdgggnlyn
irnllhipvclkwelmdedyggrlcnpsnfvshkeiesvnnavmmpahgpakmeyedavattshwvprkrrsil
ntsqrqiledqemyqrccnlfekffpssyrrpvigissmveamvsraridaridfesgrikkeefaeimktcsti
edlrrqk

SEQ ID NO: 31 (PB2, A/New Caledonia/20/1999)

merikelrnmsqsrreiltktvtdhmaikkysgrqeknpslrkmwmmamkypitadkriteimperneqgg
tlwskvndagsdrvmisplavtwwnrgpvasstihypkiykyfekverlkhgftgppvhfrnqvkiirrvdinpg
hadlsakeaqdvimevvpnevqariltsestlittkekeelqncckispimvaymlerelvrktrflpvagqts
svyievhlhtggtcweqmytpggvevrrnddvqsliaaarnivrraavsadplasllemchstqiggtmvdilrg
npteeqavdickaamglrissfsfgqftfrktsqssvkreeevltnlqtlkltvhegyeefmvgkratailr
katrrliqlivsgredeqsiveaivvamvfgsedcmvkavrgdlnfvnrangrlnpmhqlrlrhfqkdakvflnwg
iepidnvmgimiglpdmtpstemsrgrvrvskmgvdeysnaervvvsidrlfrvrdgrgnvllspeevsetqgte
kltitysmmweingpesvlnityqwiirnwetvkiqwsqntmlynkmefefqslvpkairgqysgfvrtlf
qqmrdvltgtdttqikllpfaaappkqsrmqfssltnvrvsgmrlvrgnspvfnynkttkrltlvlgkdagtl
tedpdegtagvesavlrqflilqkedrrypalsinelsnlakgekanvliqggdvvlvmkkrkrdssilttdsqta
tkrirmain

SEQ ID NO: 32 (NP, A/New Caledonia/20/1999)

masqgtrksyegmetdgerqateirasvgrmiggigrfyiqmctelkndyegrliqnsltiermvlsafderr
nkyleehpsagkdpkktgppiyrkdqkwvrelvlydkeeirriwrqannqddataglhthimiwhsnldtityqr
tralvrtgmdprmcslmqgstlprrrsagaagaavkgvgtmvlleirmikrgindrnfrvrgengrktriayermni
lkqkfqtaaqkammdqvresrnpnaeiedltflarsalilrgsvahksclpacyvgpavasgydfekegyslv
vdpfkllqtsqvyislrpnenpahksqvlvmaacnsaafedlrvssfirgrtvlprgkltstrgqiasnenmdaiv
sstlelrswairrsqgntnqqrassagqistqptfsvqrnlpfdkttimaafntegrtsdmraeiikmms
arpeevsfqgrqvfelsderatnpivspfdmsnegsyffqgnaeeydn

SEQ ID NO: 33 (M1, A/New Caledonia/20/1999)

mslltevetyvlsivpsqplkaeiaqrlelvfagkntdlealmewlkttrpilspltkgilgfvftltvpserglg
rrrfvqnalngngdpnndravklyrklkreitfhgakeialsysagalascmgliynrmgavttesafglicat
cegiadsqhkshrqmvttnplirhenrmvlastakameqmagssseqaaamevasgarqmvqamraighpss
stglkndllenlqayqkrmgvqmqrk

SEQ ID NO: 34 (NA, A/New Caledonia/20/1999)

mnpnqkiitigsisiaiigiislmqigniiiswashiqtgsqntgvcnqriitienstwnhtyvninntnv
agkdktsvtlagssslcsisgwaiytkdnisrirgskgdvfvirepffiscshlecrtffltqgallndkhsngtk
drspyralmacplgeapypynskfesvawsasachdgmglwtigisqpdngavavlkyngiitetikswkkrilr
tqesecvngscftimtdgpsngaasykifkiekgkvtksielnapnfhyeecsypdgtvvcvrdnwhgan
rpwvsnqnlidyqigycsgvfgdnprpkdgescnpvtvdgadgvgkgsfykyngvwigrtksnrlrkgfemiw
dpngwtddsfvskqdvvaiddwsqysgsvqhpeltqldcirpcfwelvrqiprenttiwtsgssisfcgvn
sdtanwswpdgaelpftidk

SEQ ID NO: 35 (PA, A/Wisconsin/67/2005)

medfvrqcfnpmivelaekamkeygedlkietnkfaaichthlevcfmysdfhfineggesivvelddpnallkhr
feieqrdrmtawtvvnsicnttgagkpkflpdlydykenrfieigvtrrevhiyylekankiksenthihifsf
tgeematkadytldeesrariktrlftirqemanrglwsdfrqsergeetieekfeitgtmrrladqslppnpsc
lenfrayvdgfepngciegklsqmskevnaiqipflkttprpiklpngppcygrskflldalkisiedpshege
qiplydaikcmkttffgwkepyivkpkhekqinsnyllswkqvlselqdieneekiprtknmktksqkwalgenma
pekvdencrdisdikqydsdepelrslsswignefnkaceltdsvwieldeigedvapiehiamrnyftaev
shcrateyimkgvyintallnascaamddfqlipmiskrctkegrrktnlygfiikgshlrndtdvvnfvsmef
sltdprlephkwekyvleiqdmlrllsaigqisrmpflyvrtngtskvkkmkgmemrcllqslqqiesmieaes

svkekdmteffenkseawpigespkgveegsigkvcrtllaksvfnslyaspqlegfsaesrklillvqalrdn
lepgtfdlgglyeaieeclindpwllnaswfnslfthalk

SEQ ID NO: 36 (PBI, A/Wisconsin/67/2005)

mdvnpntlflkvpqnaisttffpytdppyshtgtgymtdvnrthqysekgkwtntetgapqlnpidgplpe
dnepsqyaqtdcvleamafleeshpgifenscletmeavqqrdrvdrldtqgrqdydwtlnrnqpaatalantievf
rsngltanesgrlidflkdvmesmdkeemeitthfgrkrvrdrnmtkkmvtqrtigkkqrvnkrgyliraltln
tmtkdaergklrraiatpgmqirgfvfvetlarsiceklegsglpvggnekaklanvvrkmmtnsqdtefsf
titgdntkwnenqnrpmflamityitknqpewfrnilsiapimfnskmarlgkqymfeskrmlrtqipaemas
idlkynestrrkkiekirpllidgtaslsqgmmgmfnmlstvlqvsilnlqgkkytkttywwdglqssddfali
vnapnhgegigagvnrfrtcklvginmskkksyinktgtfestsffryygfvanfsmelpsfgvsginesadmsi
qvtviknminndlgpataqmalqlfikdyrytyrchrqdtqigtrrsfelkklwdqtqsrallvsdgggnlyn
irnlnhipevcklkwelmdenyrglcnplnqpfvshkeiesvnnavvmpahgpaksmeydavattthswipkrnsil
ntsqrqilededemykocnlfekffpsyyrrpigiissmveamvsraridaridfesgrikkeefseimkicsti
eelrrqr

SEQ ID NO: 37 (PB2, A/Wisconsin/67/2005)

merikelrnlnsqsrtrreiltktvdhmalikkysgrqeknpslrmkwmmankypitadkritevperneqgq
tlwskmsdagadrvmvsvplavtwwnrnpvtstvhypkyktyfdkverlkhgtfgpvhfrnqvkiirrvdinpg
hadlsakeaqdvimevvpnevgariltsestltitkkeelrdckisplmvaymlerelvrktrflpvagqts
siyievhlhtqgtcweqmytpggevrnddvdqsliaarnivraavsadplasllemchstqiggtmrvdilrg
npteeqavdicakaamglrissfsfgqftfkrtsqssvkkkeevltgnlqtlkirvhogyeeftmvqkratailr
katrrlvqlivsgqrdeqsiaaeiivamvfsqedcmikavrgdlnfvnrangrlnpmhgllrhfqkdakvlfqngw
iehidsvmgmvqvlpdmtpstemsrgirvskmgvdeysstervvvsidrflrvdrqrgvllspeevsetqgte
rltityssmmweingpesvlnvtyqwiirneavkiqwsqnpamlynkmefepfqsivpkairsqysgfvrtlf
qdmrdvlgtdfdttqikllpfaaappkqsrnqfssaltvnrvgagmrilvrgnspvfnynkttkrltilgkdagtl
iedpdestsqvesavlrqfliigkedrroygpalsinelnlakgekanvligqgdvvlvmkrkrdssilttdsqta
tkrirmain

SEQ ID NO: 38 (NP, A/Wisconsin/67/2005)

masqgtrksyqmetdgdqrdnateirasvgkmidgigrfyiqmctelklsdyegrliqnsltiekmvlsafder
nkyleehpsagkdpkktgpiyrrvdgkwmrelvlydkeeirriwrqanngedatagltihimiwhsnldatyr
tralvrtqmdprmcslmqgatlprrrsgaagaavkqigtmmvmlirmvkrqindrnfwrngengrkrtsayerm
lkgkfqtaaqramvdqvresrnpqnaeiedlflarsalilrgsvahksclpacvygpavssgynfekegyslv
idpflklqnsqvyslirpnenpahksqlvwmachsaafedrlrlsfirgtkvsprgk1strgvqiasnenmdnm
sgtlelrsqywaitrsqgnnqrasagqtsvqptfsvqrnlpfekstimaafgntegrtsdmraeiirmmeg
akpeevsfrgrgvfelsdekantpivpsfdmsneqsyffqdnaeeydn

SEQ ID NO: 39 (M1, A/Wisconsin/67/2005)

mslltevetvylsivpsgplkaeiaqrledvfvagkntdlealmewlkrpilspltkgilgvftltvpserglq
rrrfvqnalngndpnmkdkavklyrklkreitfhgakei alsysagalascngliynrmgavttevafglvcat
ceqiadsqhrshrqmvattnplirhenrmvlastakameqmagssqaaeameiasqarqmvmqraighpss
stqlrdlilenlqtyqkrmgvqmqrfk

SEQ ID NO: 40 (M2, A/Wisconsin/67/2005)

mslltevetpirnewqrcrndssdplvvaaniqihlilwilrdrlffkcvyrlfkhglkrpsteqgvpesmree
yrkeqnavdaddshfvsiele

SEQ ID NO: 41 (NS, A/Wisconsin/67/2005)

AATGGATTCCAACACGTGTCAAGTTCCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATATCCGGAACAAGTTGTAGACCA
AGAACTGAGTGATGCCCAATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAGGTCCCTAAGGGGAAGAGGCAACTCT
CGGTCTAGACATCAAAAGCAGCCACCCATGTGGAAAGCAAATTTAGAAAAGATTCTGAAAAGAAGAACTGTATGA
GGCACTTAAAATGACCATGGTCTCCACACCTGCTTCGCATACATAACTGACATGACTATTGAGGAATTTGCAAG
AAACTGGTTTCATGCTAATGCCCAAGCAGAAAGTGGAAAGGACCCTTTTGATCAGAAATGGACCAGGCAATCATGGA
GAAAACATCATGTTGAAAGCGAATTTCAAGTGTGATTTCTGACCGACTAGAGACCATAGTATTACTAAGGGCTTT
CACCGAAGAGGGAGCAATTTGTTGGCGAAATCTCACCATGCTTTCTTTCCAGGACATACTATTGAGGATGTCAA
AAATGCAATTTGGGGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCCGAGTCTCTAAAAATCTACAGAG
ATTCGCTTGGGAAGCAGTAATGAGAATGGGGGACCTCCACTTACTCCAAAACAGAAACGGAAAAATGGCGAGAAC
AGCTAGGTCAAAGTTGAAAGATAAGATGGCTGATTGAAGAAAGTGAGACACAGACTAAAAACAACGTAAAAATA
GCTTTGAACAAATAACATTCATGCAAGCATTACCACTGCTGTTTGAAGTGGAAACAGGAGATAAGAACCTTCTCAT
TTCAGCTTATTTAATGATAAA

SEQ ID NO: 42 (HA, A/Wisconsin/67/2005)

mktiaalsyilclvfaqklpgndnstatlclghhavgpntivktitndqievtnatelvqssstggicdsphqil
dgenctlidallgdqcdqfqnkkwldfverskaysncypydvpyaslrlsvassgtlefndesfnwtgvtqng
tssackrrsnnsffsrlnwlthlkfkyपालवतम्पनेकफडक्यिगवvhpvtdndqiflyaqasgritvstkr
qqtvipnigsprirniprnsislywtivkpgdillinstgnliaprgyfkirsgkssimrdsapigkcnsecitp
ngsipndkpfqsnvrityqacpryvkqntlklatgmrnvpekqtrgifgaiaagfiengwegmvdgwygfrhqnse
gigqaadlkstqaainqingklnrligktnekfhqiekefsevegriqdlekyvedtkidlwsynaellvaleng
htidldsemnklferkqlrenaedmgngcfkiyhkcdnacigsirngtydhdyrdealnrfqikgvelks
gykdwilwisfaiscfllevallqfimwacqkgnircnici

SEQ ID NO: 43 (NA, A/Wisconsin/67/2005)

mnpnqkiiitigsvsstisticffmqiaailittvtlhfkqyefnsppnngvmlceptiierniteivyiltnttiek
eicpklaeyrnwskpqcniitgafpfskdnsirlsaggdiwvtrepyvscdpdkcyqfalgggtllnnvhsndtvh
drtpyrtilmnelgypfhlgtkqvciawsssschdkgawlhvovtgddknatasfiyngrlvdsivswskeilrt
qesecvcingtctvmtdqasagkadtkilfieegkivhtstlsgsaqhveecscypylgvzcvcrdnwkganr
pivdinikdysivssyvcsglvgdtpkndssssshclpneeggghgkvkwaiddgndvwmgrtiseklrsyge
tfkviwegwspnslqinrqvivrgrnrgsgygsifsvgekgscinrcfyvelirgrkeetevlwtsnsivvfctg
qtygtgswpdqadinlmpi

SEQ ID NO: 44 (PA, 105p30)

medfvrqcfnpmivelaekamkeygedpkietnkfaaichthlevcfmysdfhfidergesiiivesgdpnallkhr
feiiiegrdrimawtvnsicnttqvekpkipdlydykenrfieigvtrrevhiyyekankiksektihihifs
tgeematkadytldeesrariktrlftirqemaskslwdsfrqsergeeteieekfeitgtmrkladqslppnfps
lenfrayvdgfepegncieqklsqmskevnakieplrttprplrlpdgplchqrskflldalksiedpshege
giplydaikcmkrtffgwkepnivkpkhekginpnymawkqvlaelqdieneekiprtknmkrtsqlkwalgenma
pekvdfdcdkvdgdlkqydsdepeprslasvqnefnkaceltdsswieldeigedvapiehasmrrnyftaev
shcrateyimkgvyintallnascaamddfqlipmiskcrtkegrrktnlygfikgrshlrndtdvvnfvsmef
sldtprlephkwekycvleigdmllrtaigqvsrpflyvrtngtskikmkwgemrrollqslqgiesmieaes
svkekdmteffenksetwpigesprqveegsigkvcrtllaksvfnslyaspqlqegfsaesrklilivqalrdrn
lepgtfdlqgllyeaieeelindpwllnaswfnslthalk

SEQ ID NO: 45 (MI, 105p30)

mslltevetyvlsivpsqplkaeiaqrlnvfaqkntdlealmewktrpilspltkgilgfvftltvpserglg
rrrfvqnalngngdpnmdkavklyrklkreitfhgakeialsysagalascmgliynrmgavtttesafglicat
ceqiadsqhkshrmvtttnplirhenrmvlasttakameqmagssseqaaamevasgarqvmvqamraigthps
stglkndllenlqayqkrmgvqmqrk

SEQ ID NO: 46 (A/Texas/1/77 PBI)

mdvnpntlflkkipaqnaisttffpytgppyshtgtgymtdtvnrthqysekgkwtnttetgapqlnpidgppe
dnepsgyaqtcdvleamafleeshpgifenscletmevqqtrvdrldtqgrqtdwtlnrnqpaatalantievf
rsngltanesqrlidflkdvmesmdkeeieitthfqrkrvrdrnmtkkmvtqrtigkkqrvnkrlylialtln
tmtkdaergklkrraiatpgmqirgfvfyvetlarsicekleqsglpvggnekaklanvvrkmmntnsqdtelsf
titgdntkwnenqprmlamityitknqpewfrnilsiapimfsnkmarlgkgymfeskrmklrtqipaemlas
idlkynestrkkiekirpplidqtsalspgmmgmfnmlstvlgsilnlqgkkytkttywwdglqssddfalli
vnapnheqiaqvdryfyrctklvqinmskksyinartrgtfeftsffyrvgfvanfsmelpsfgvsginesadmsi
gvtviknminndlgpataqmalqlfikdyrytyrchrqdtqigtrrsfelkklweqtrskagllvsdggpnlyn
irnlhipevclkwelmeddyqgrlcnplnplfvshkeiesvnnavvmpahgpaksmeydavathshwipkrnsil
ntsqrqiledqmyqkcnlfeffpassyrrpvgissmveamvrsraridaridfesgrikkeefseimkicsti
eelrrqkq

SEQ ID NO: 47 (A/Puerto Rico/8/34 PA)

medfvrqcfnpmivelaektmkeygedlkietnkfaaichthlevcfmysdfhfineggesiiivelgdpnallkhr
feiiiegrdrimawtvvnsicnttgaekpkfipdlydykenrfieigvtrrevhiyyekankiksektihihifs
tgeematkadytldeesrariktrlftirqemaarglwdsfqsergeeteieerfeitgtmrkladqslppnfps
lenfrayvdgfepegnyieqklsqmskevnarieplkttprplrlpnpqpsqrskflldalksiedpshege
giplydaikcmrtffgwkepnvvpkhekginpnyskqvlaelqdieneekipktknmkrtsqlkwalgenma
pekvdfdcdkvdgdlkqydsdepelrslaswignefnkaceltdsswieldeigedvapiehasmrrnyftsev
shcrateyimkgvyintallnascaamddfqlipmiskcrtkegrrktnlygfikgrshlrndtdvvnfvsmef
sldtprlephkwekycvleigdmllrtaigqvsrpflyvrtngtskikmkwgemrrollqslqgiesmieaes
svkekdmteffenksetwpigespkqveessigkvcrtllaksvfnslyaspqlqegfsaesrklilivqalrdrn
lepgtfdlqgllyeaieeelindpwllnaswfnslthals

SEQ ID NO: 48 (A/Puerto Rico/8/34 NP)

masqgtrksyemtdqgergnateirasvgkmigqgrfyiqmctelklsdyegrliqnsltiermvlsafderr
nkyleehpsagkdpkktggpiyrrvngkwmrelilydkeeirriwrqanngddataglhmmiwhsnlndatyqr
tralvrtgmdprmcslmqgstlprsgaagaavkgvgtmvmelvrmiqrgindrnfwrngengrktriayermcni
lkqkfqtaaqkammqdvresrdpnaefedltflarsalilrgsvahksclpacvygpavasgydferegyslvq
idpfrlilqnsqvyslirpnenpahks

SEQ ID NO: 49 (A/Puerto Rico/8/34 M)

msllteveyvlsiiipsqplkaeiaqrledvfagkntdlevlmewlktrpilspltkgilgfvftltvpserglq
rrrfvqnalngngdpnmdkavklyrkklkreitfhgakeislsysagalascmgliynrmgavttevafglvcat
ceqiadsqhrshrqmvttnplirhenrmvlasttakameqmagseqaaeamevasgarqmvqamrtigthpss
saqlkndillenlqayqkrmqvmqrfk

SEQ ID NO: 50 (HA, A/California/04/09)

mkailvlllytfatanadtlcigyhannstdtdvtvleknvtvthsvnlledkhngklcklrgvaphlhgkcnia
gwilgnpeceslstasswyivetpssdngtcypgdfidyeelreqlssvssferfeifpktsswpnhdsnkgt
aacphagaksfyknliwlvkgnsyplksyindkgkevlvlwgihhpstsadqqslyqnadyvfvgsrlysk
kfkpeiairpkvrdqegrmnyywtlvepgdkitfeatgnlvvpryafamernagsqiiisdtpvhdcnttcqtpk
gaintslpfnihpitigkcpkyvstklrlatqlrnipsiqsrglfgaiagfieggwtgmvdgwygyhhqnegg
sgyaadlktstqnaideitnkvnsviekmntqftavgkefnhlekenlnkkvddgfldiwtynaellvllener
tldyhdsnvknlyekvrsqknnakeigngcfehyhkdntcmesvknqdydykyseeaklnreeidgvklest
riyqilaiystvasslvlvslgaisfwmcnsqslqcrici

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus recombinante de gripe A que puede crecer hasta títulos virales más altos en células MDCK en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento en comparación con A/Puerto Rico/8/34, donde el virus recombinante de gripe A comprende segmentos del eje principal de dos cepas donantes, donde los segmentos virales PB1 y PB2 son de la cepa donante 105p30 y (a) tienen al menos 95% identidad con las secuencias de SEQ ID Nos: 18 y 19, o (b) codifican polipéptidos que tiene la menos 99% identidad con las secuencias de polipéptido codificadas por SEQ ID Nos: 18 y 19, donde al menos un segmento viral del eje principal del virus recombinante de gripe A es de la cepa donante PR8-X, y donde:
- 10 a) el segmento PA del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que es al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 9 y 17, el segmento M del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 13 y 21, el segmento NP del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 12 y 20, el segmento NS del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 14 y 22; o
- 15 b) los segmentos virales del eje central codifican polipéptidos que tiene al menos 99% identidad con las secuencias de polipéptido codificadas por SEQ ID Nos: 12-14 o 20-22.
- 20 2. El virus recombinante de gripe A de la reivindicación 1, donde el virus de gripe A comprende un segmento de genoma M que tiene lisina en la posición correspondiente al aminoácido 95 de la SEQ ID NO: 33 cuando se alinea con la SEQ ID NO: 33 usando un algoritmo de alineamiento de pares.
- 25 3. El virus recombinante de gripe A de la reivindicación 2, donde la cepa de gripe A es una cepa H1N1.
- 30 4. El virus recombinante de gripe A de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un segmento viral del eje principal:
- (a) tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 20; o
- (b) tiene la secuencia de SEQ ID NO: 14; o
- (c) codifica la misma secuencia de aminoácido que la secuencia de SEQ ID NO: 14; o
- (d) codifica los mismos polipéptidos que las secuencias SEQ ID NOs: 18-22.
- 35 5. El virus recombinante de gripe A de la reivindicación 1, donde el virus comprende además un segmento viral que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NOs: 17-22.
- 40 6. Un método *in vitro* para preparar un virus recombinante de gripe A que comprende las etapas de:
- (i) introducir en un huésped de cultivo una o más construcciones de expresión que codifican los segmentos virales necesarios para producir un virus de gripe A donde los segmentos virales del eje central son de dos cepas donantes; y
- (ii) cultivar el huésped de cultivo con el fin de producir virus recombinante de gripe A;
- 45 donde el virus recombinante de gripe A puede crecer hasta títulos virales más altos en células MDCK en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de crecimiento en comparación con A/Puerto Rico/8/34, donde el virus recombinante de gripe A comprende segmentos del eje principal de dos cepas donantes, donde los segmentos virales PB1 y PB2 son de la cepa donante 105p30 y (a) tienen al menos 95% identidad con las secuencias de SEQ ID Nos: 18 y 19, o (b) codifican polipéptidos que tiene la menos 99% identidad con las secuencias de polipéptido codificadas por SEQ ID Nos: 18 y 19, donde al menos un segmento viral del eje principal del virus recombinante de gripe A es de la cepa donante PR8-X, y donde:
- 50 a) el segmento PA del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que es al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 9 y 17, el segmento M del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 13 y 21, el segmento NP del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 12 y 20, el segmento NS del virus recombinante de gripe A tiene una secuencia que tiene al menos 95% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 14 y 22; o
- 55 b) los segmentos virales del eje central codifican polipéptidos que tiene al menos 99% identidad con las secuencias de polipéptido codificadas por SEQ ID Nos: 12-14 o 20-22.
- 60 7. El método *in vitro* de la reivindicación 6 donde al menos una construcción de expresión comprende una secuencia que tiene 90% identidad con una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID Nos: 12-14 y 18-22.
- 65

8. El método *in vitro* de la reivindicación 6 o reivindicación 7, que además comprende la etapa (iii) de purificar el virus recombinante obtenido en la etapa (ii).
- 5 9. Un método *in vitro* para producir virus de la gripe, que comprende las etapas de (a) infectar un huésped de cultivo con el recombinante del virus de la gripe de las reivindicaciones 1-5; (B) cultivar el huésped de la etapa (a) para producir el virus; y opcionalmente (c) purificar el virus obtenido en la etapa (b).
- 10 10. Un método *in vitro* para preparar una vacuna, que comprende las etapas de (a) preparar un virus por el método de la reivindicación 9 y (b) preparar la vacuna del virus.
11. El método *in vitro* de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el huésped de cultivo es (a) un huevo de gallina embrionado o (b) una célula de mamífero, por ejemplo una célula MDCK, Vero o PerC6.
- 15 12. El método *in vitro* de la reivindicación 11 (b), en el que la célula crece (a) adherentemente o (b) en suspensión.
13. El método *in vitro* de la reivindicación 12 (b), en el que la célula MDCK es la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219).
- 20 14. The *in vitro* method of one of claims 9 to 13, wherein
(i) step (b) involves inactivating the virus; and/or
(ii) the vaccine is a whole virion vaccine, a split virion vaccine, a surface antigen vaccine or a virosomal vaccine;
and/or
(iii) the vaccine contains less than 10ng of residual host cell DNA per dose; and/or
25 (iv) at least one of the influenza strains is of the H1, H2, H5, H7 or H9 subtype.
14. El método *in vitro* de una de las reivindicaciones 9 a 13, en el que
(i) la etapa (b) implica la inactivación del virus; y/o
30 (ii) la vacuna es una vacuna de virión completa, una vacuna de virión dividida, una vacuna de antígeno de superficie o una vacuna virosomal;
y/o
(iii) la vacuna contiene menos de 10 ng de ADN residual de la célula huésped por dosis; y/o
35 (iv) al menos una de las cepas de influenza es del subtipo H1, H2, H5, H7 o H9.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIG. 1(A)

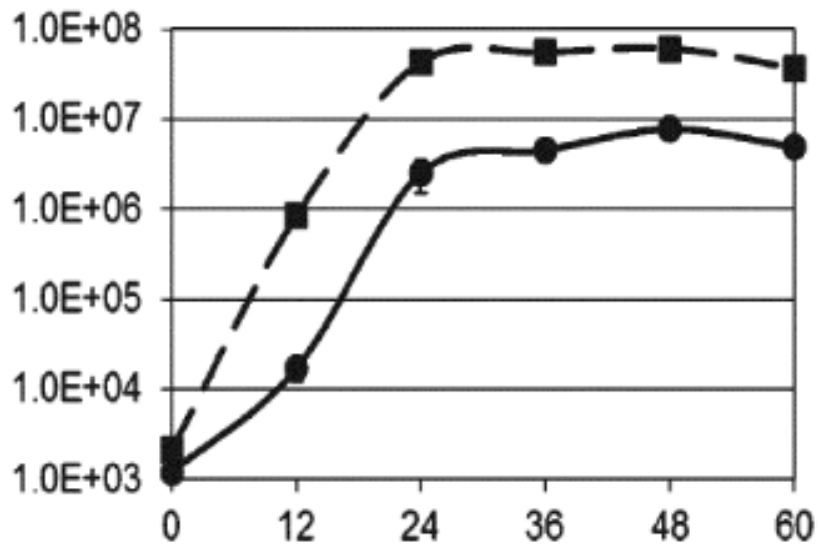


FIG. 1(B)

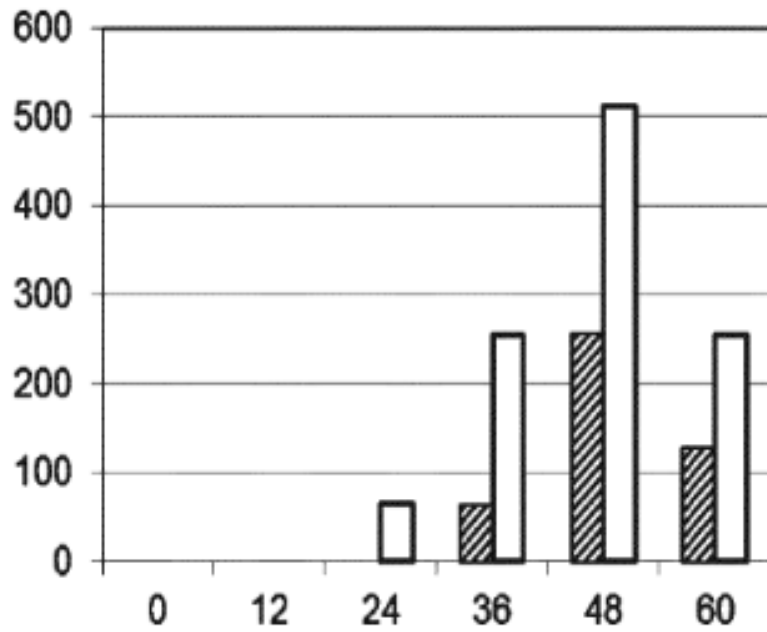


FIG. 2(A)

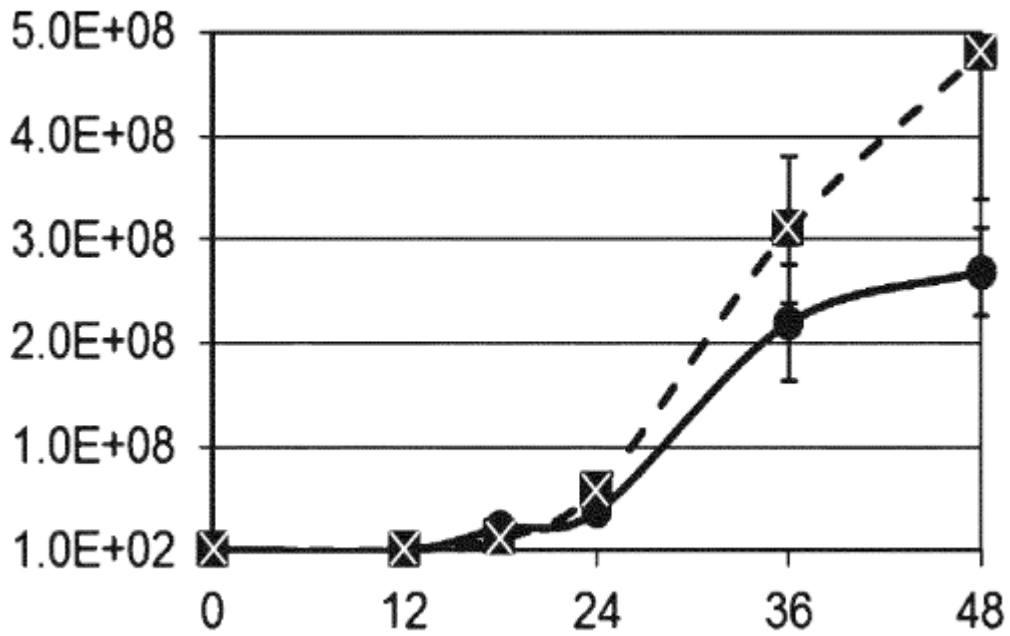


FIG. 2(B)

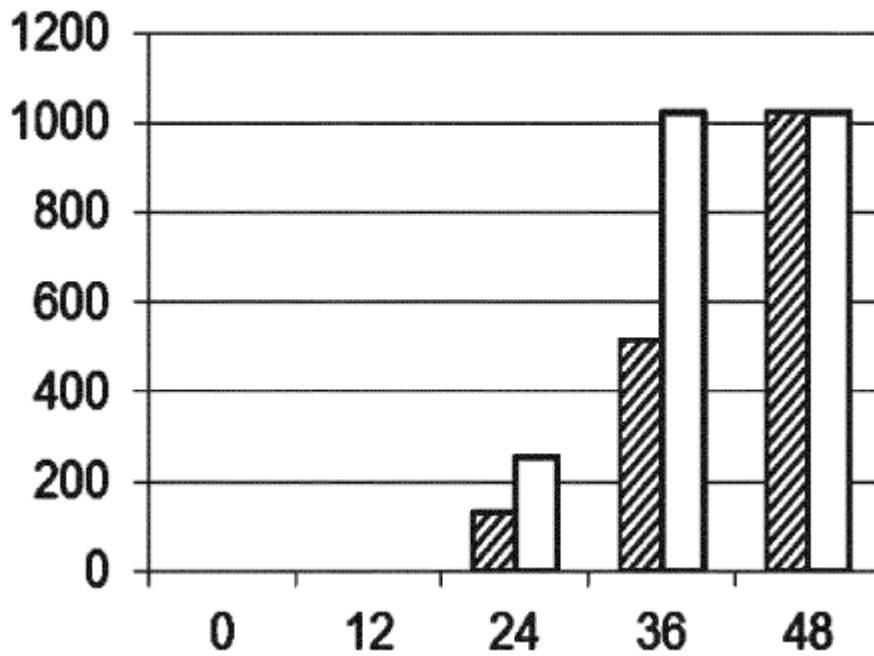


FIG. 3(A)

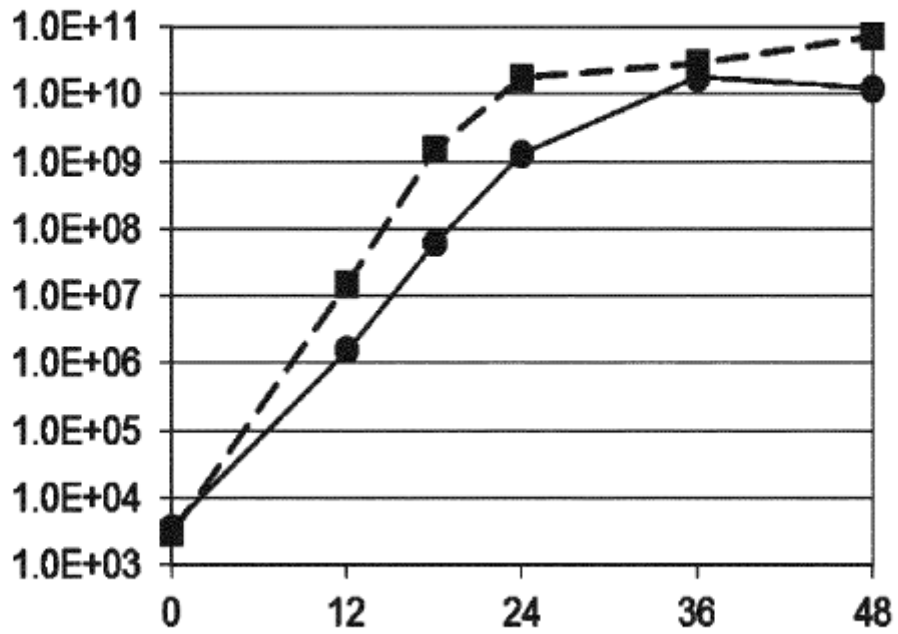


FIG. 3(B)

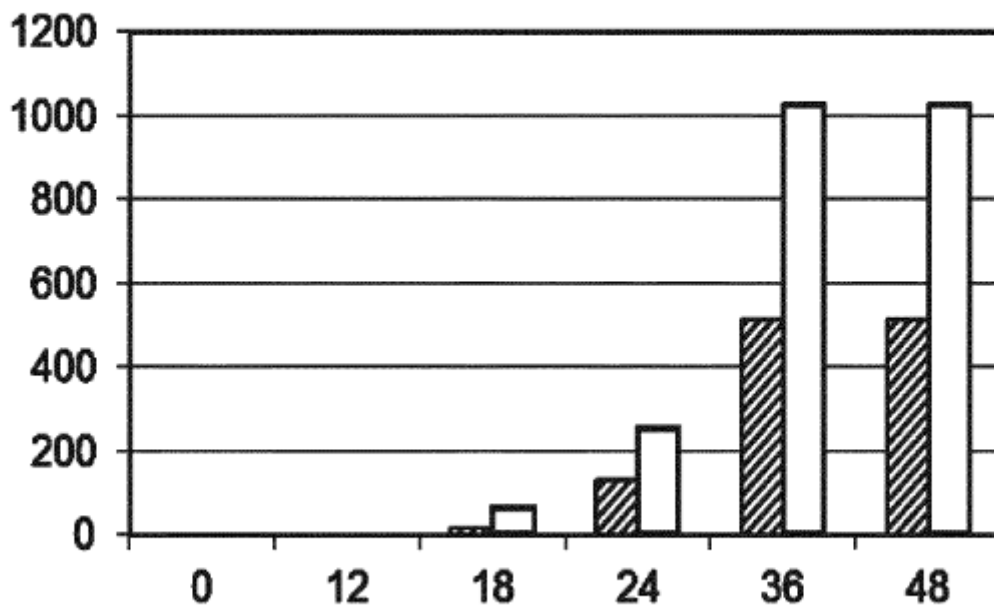


FIG. 4(A)

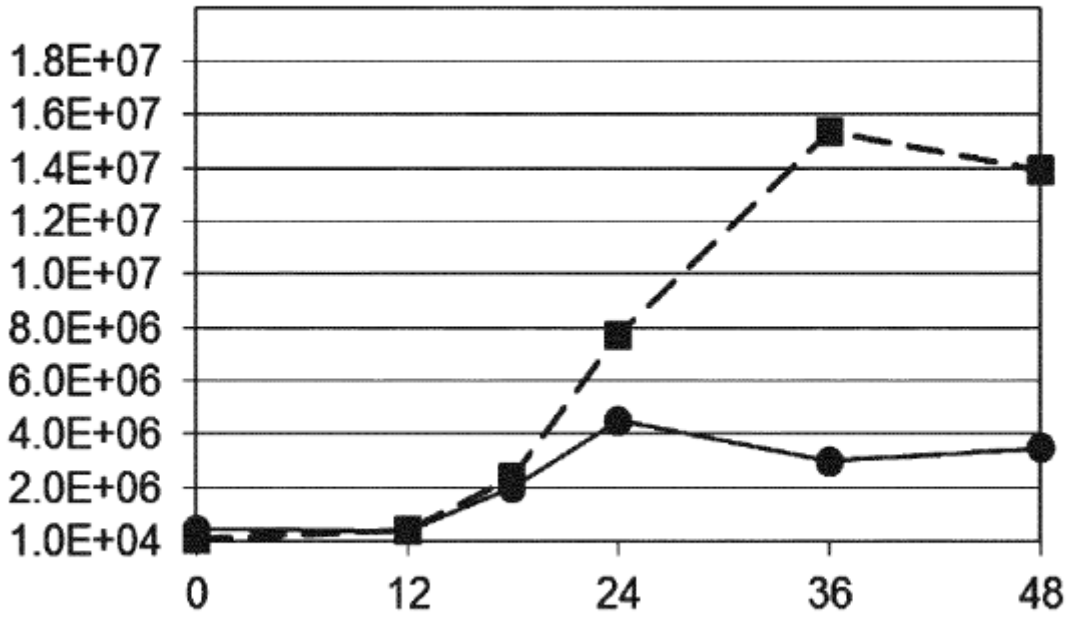


FIG. 4(B)

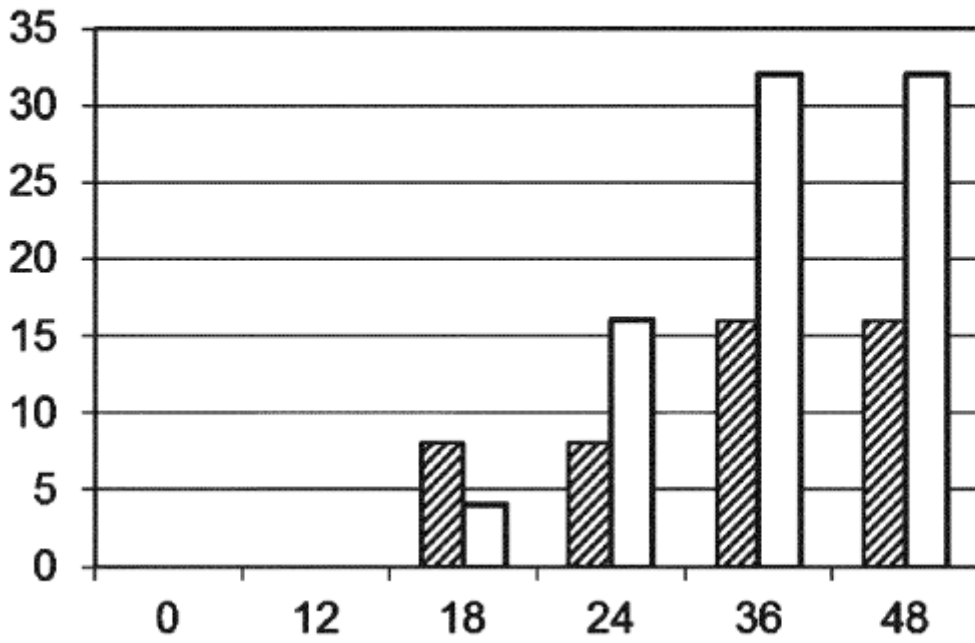


FIG. 5(A)

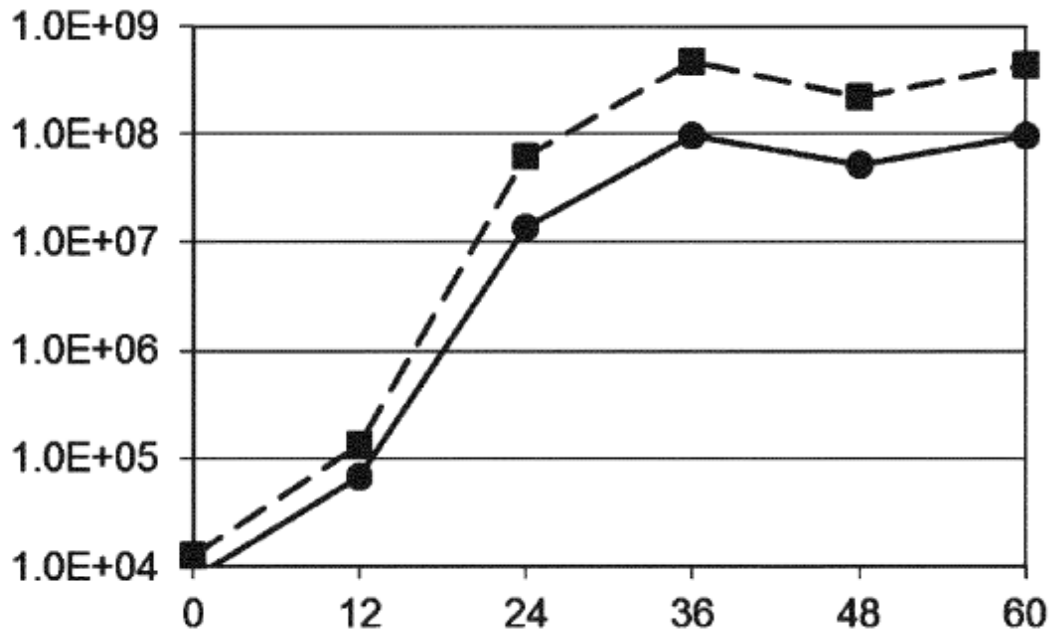


FIG. 5(B)

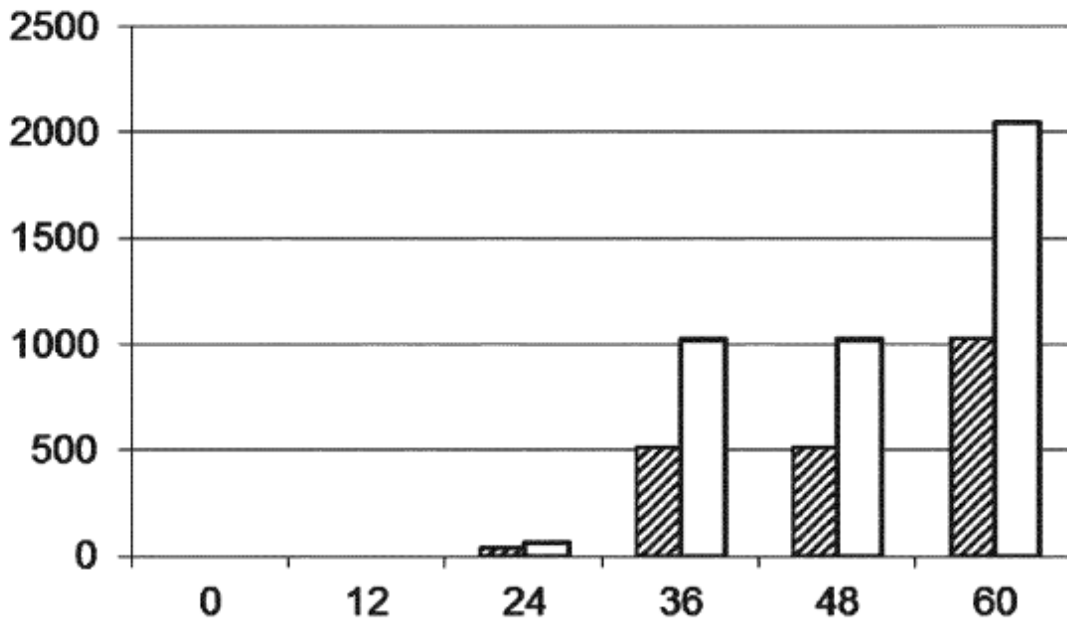


FIG. 6(A)

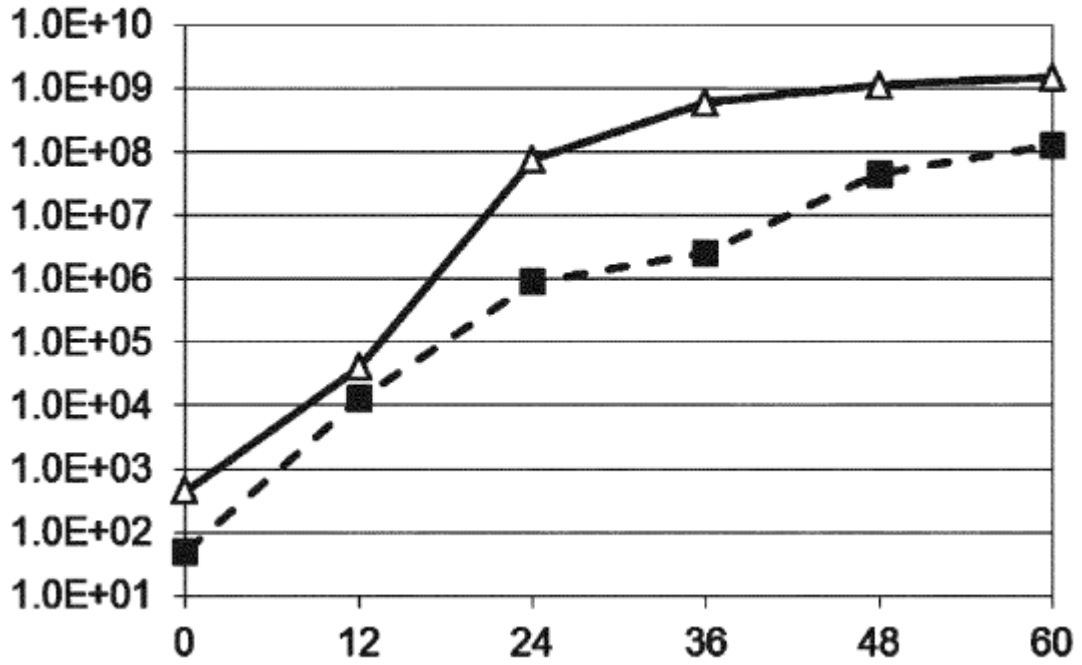


FIG. 6(B)

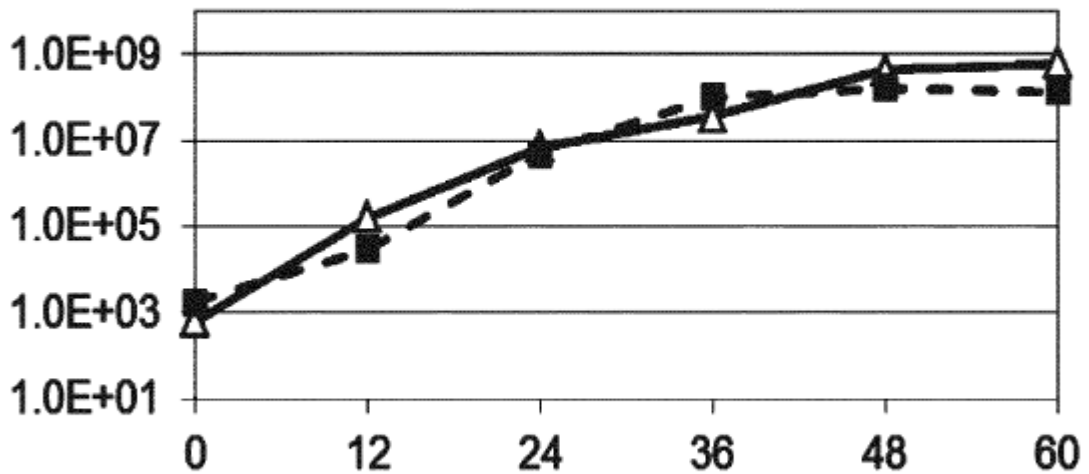


FIG. 7(A)

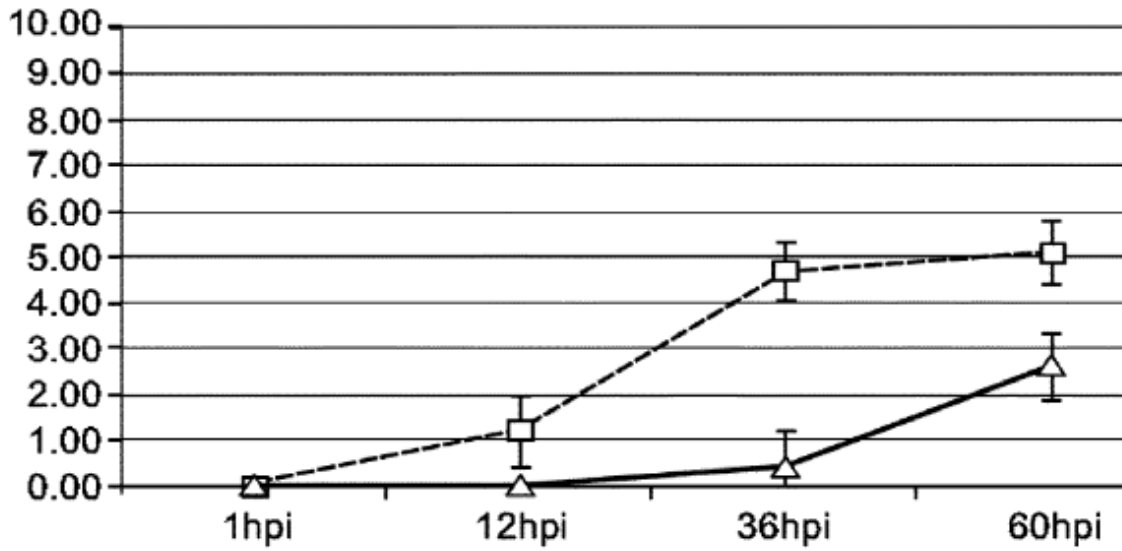


FIG. 7(B)

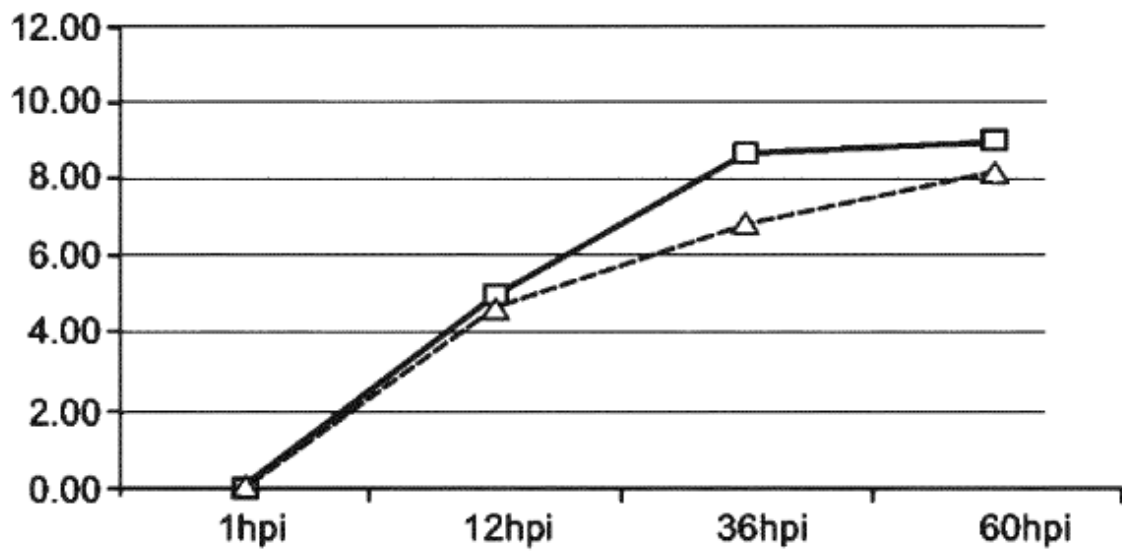


FIG. 8(A)

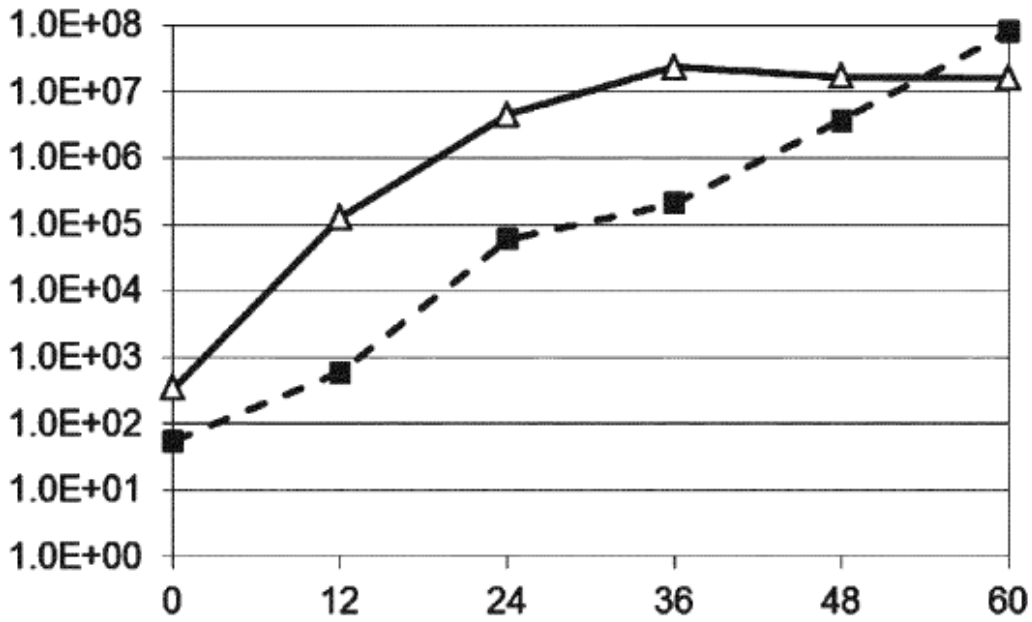


FIG. 8(B)

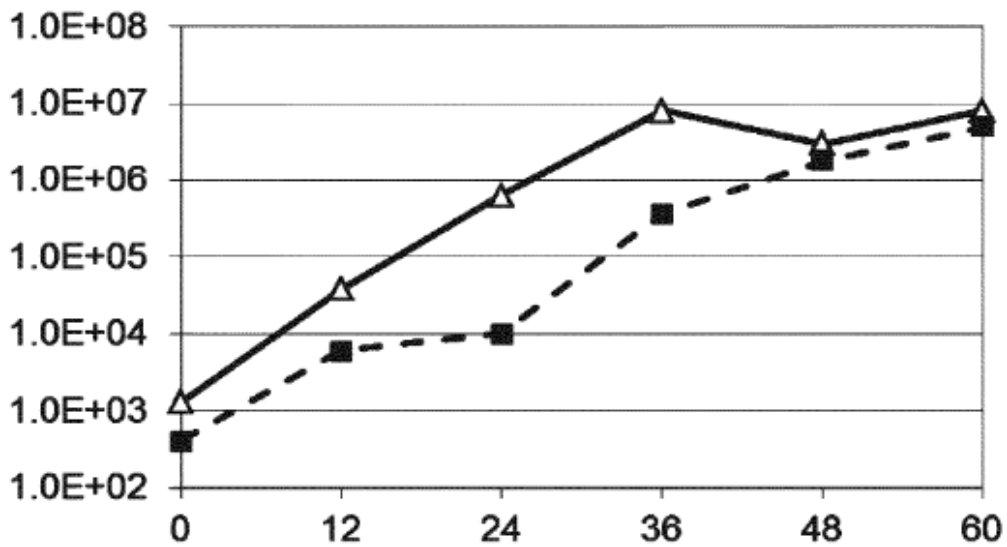


FIG. 9(A)

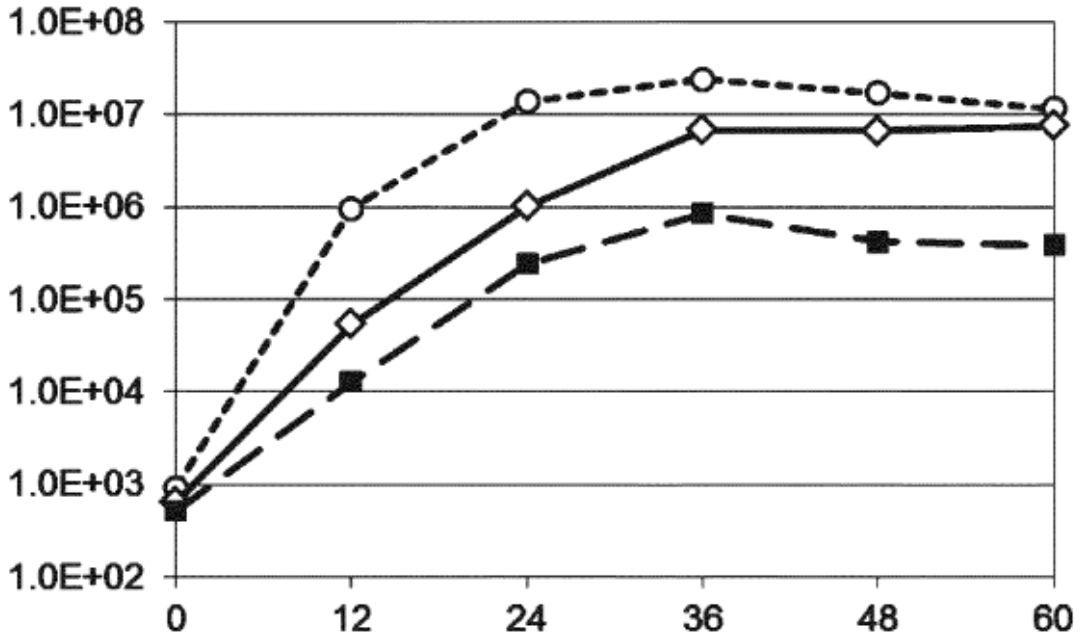


FIG. 9(B)

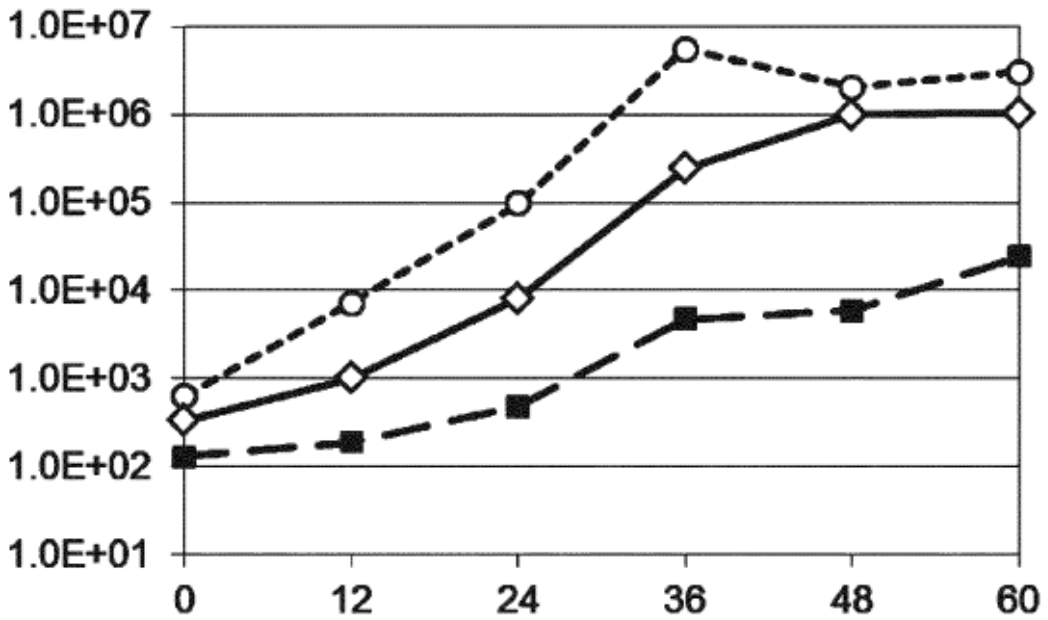


FIG. 10(A)

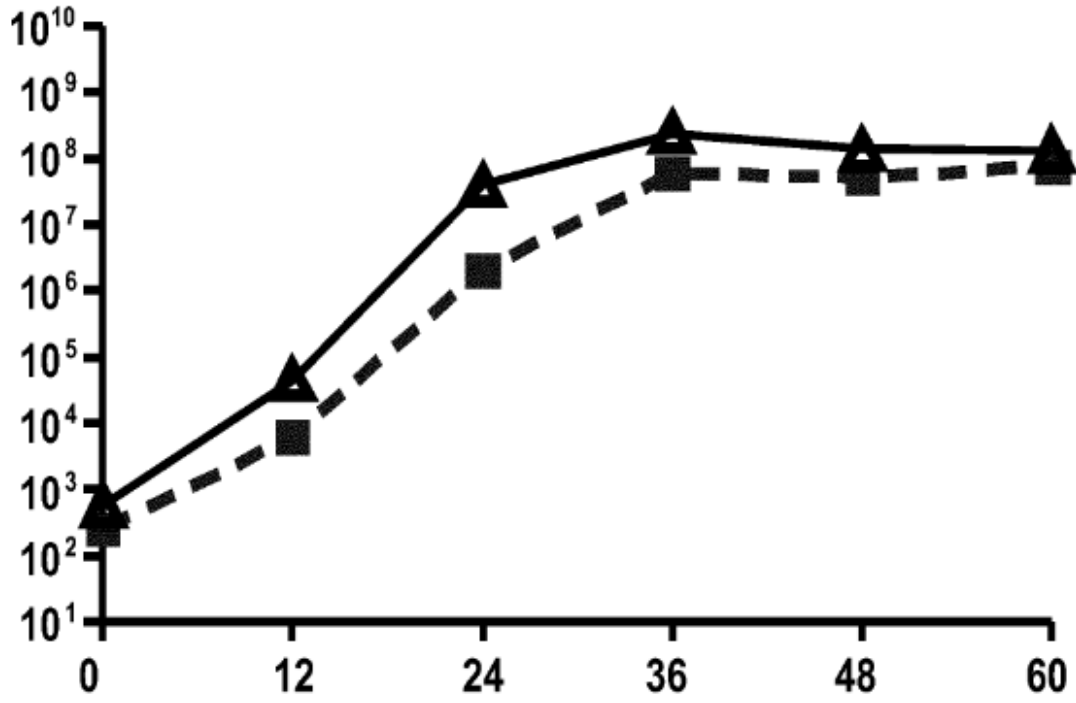


FIG. 10(B)

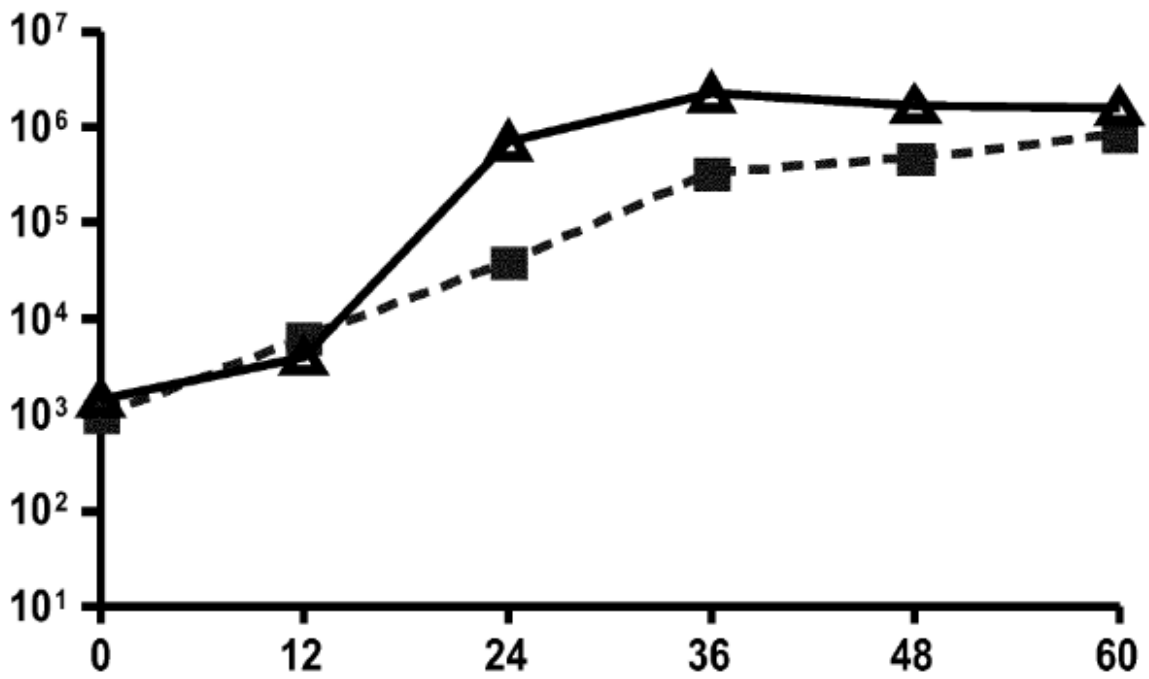


FIG.10(C)

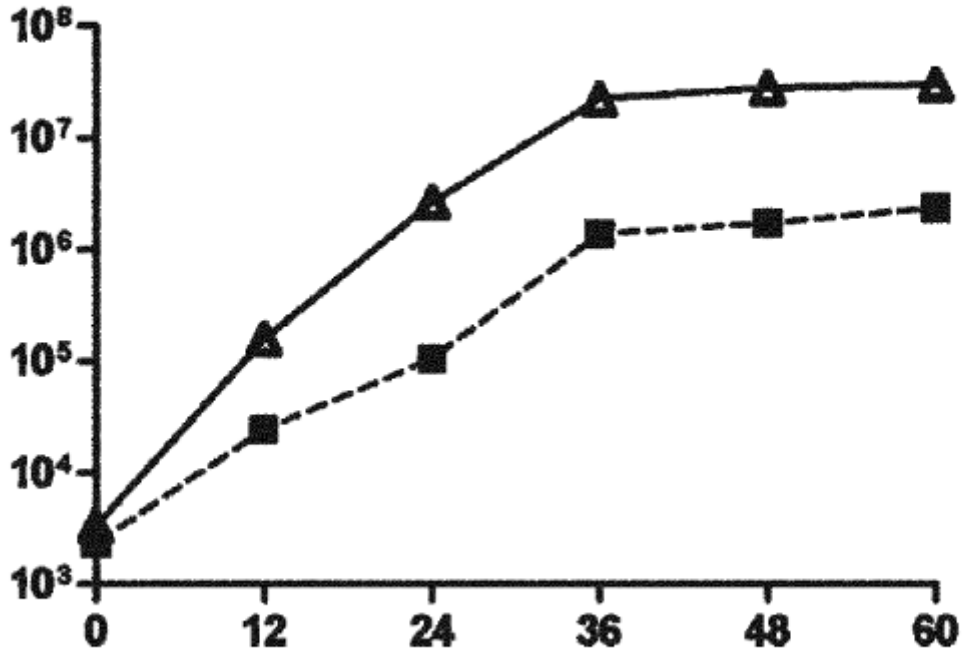


FIG. 10(D)

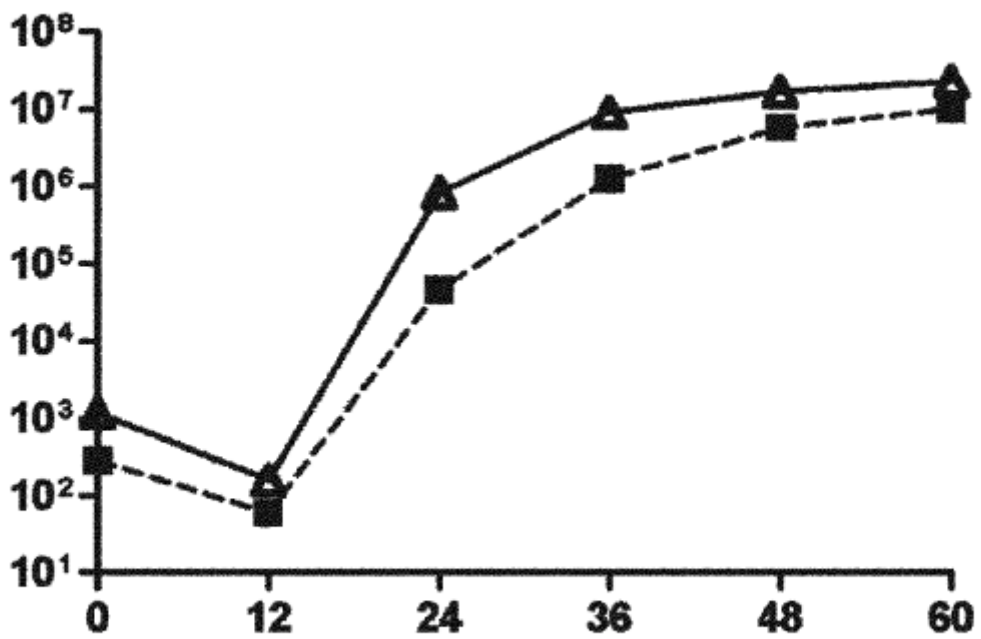


FIG. 10(E)

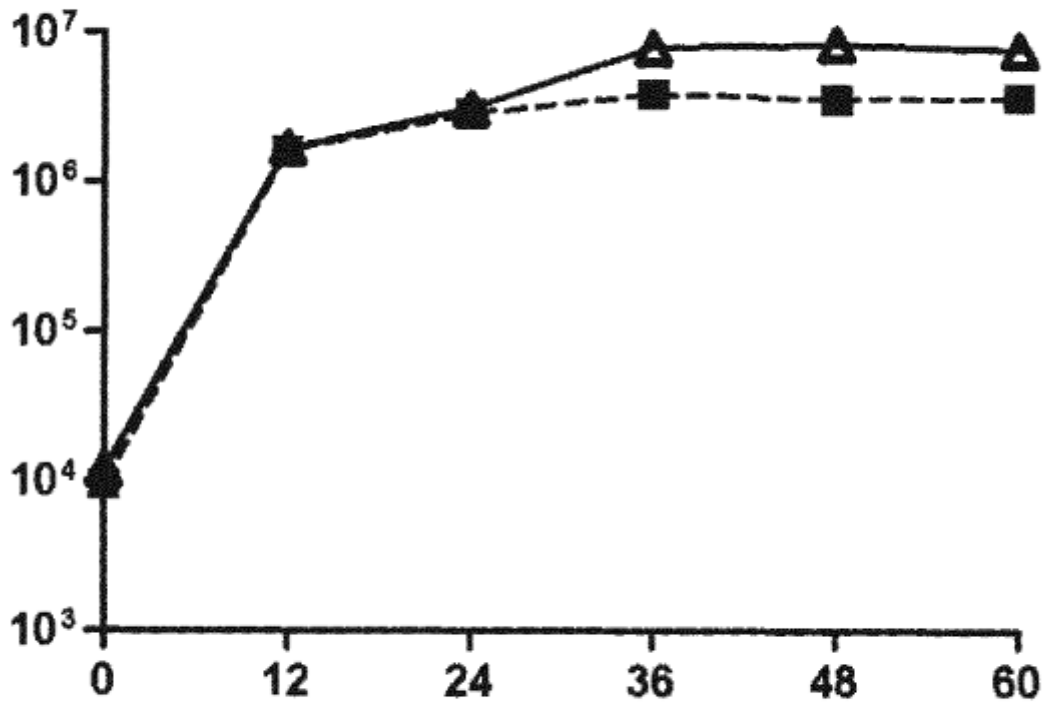


FIG. 11(A)

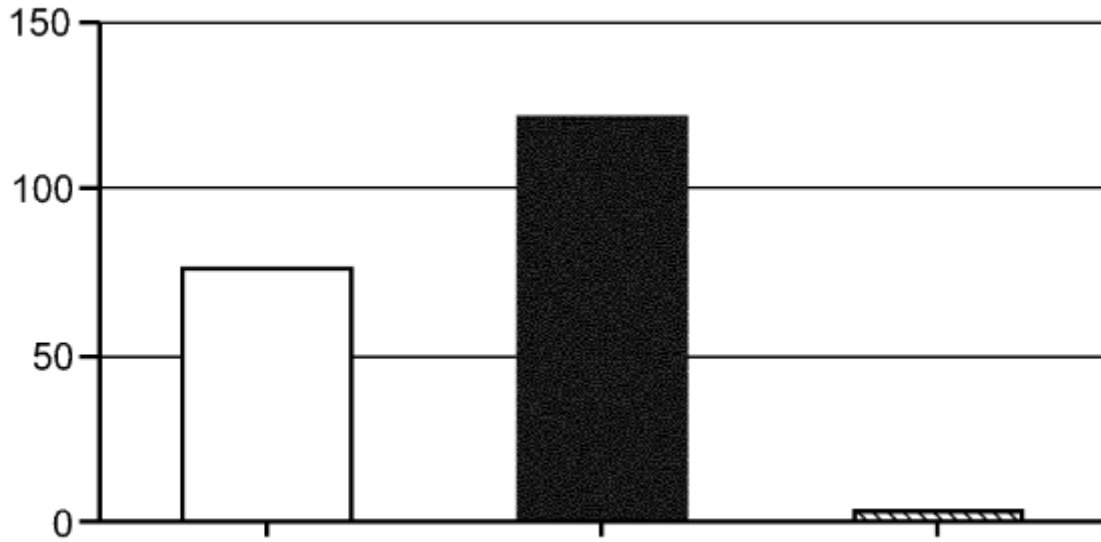


FIG. 11(B)

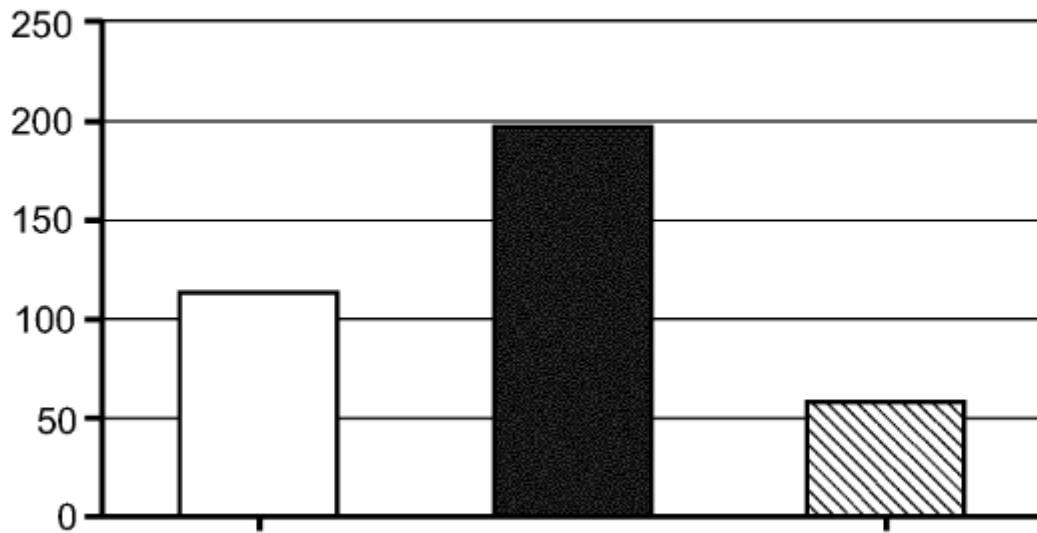


FIG. 11(C)

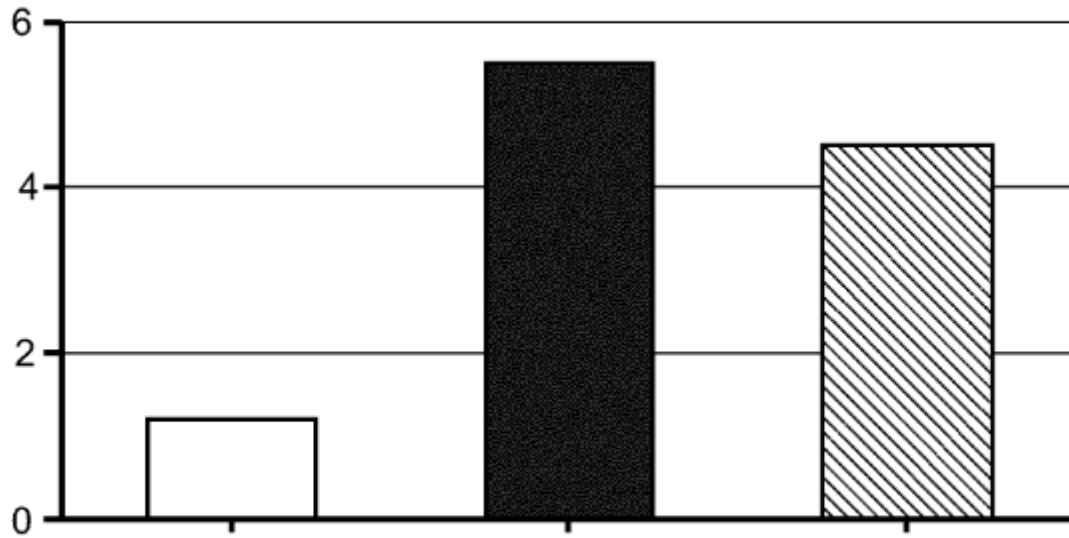


FIG. 11(D)

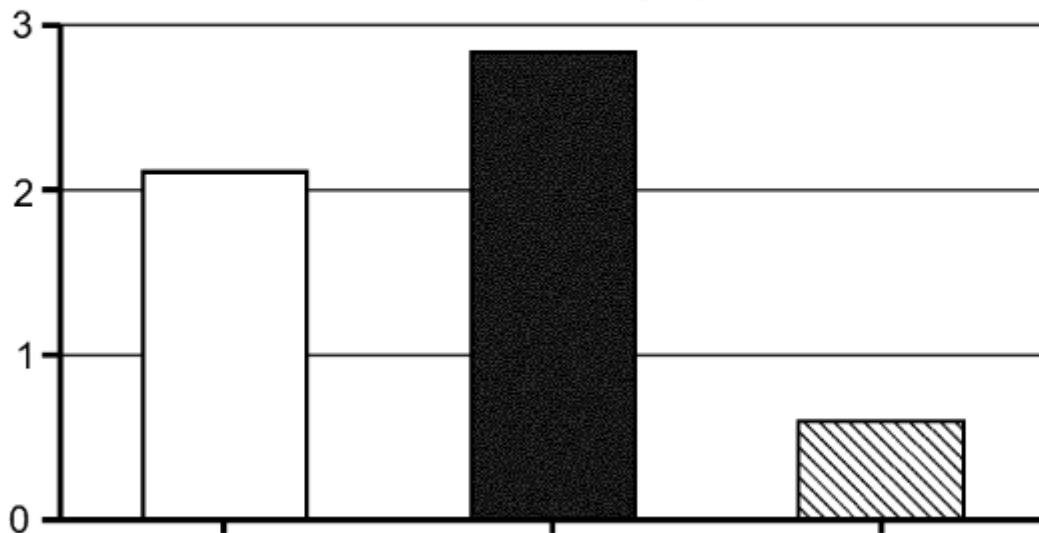


FIG. 12

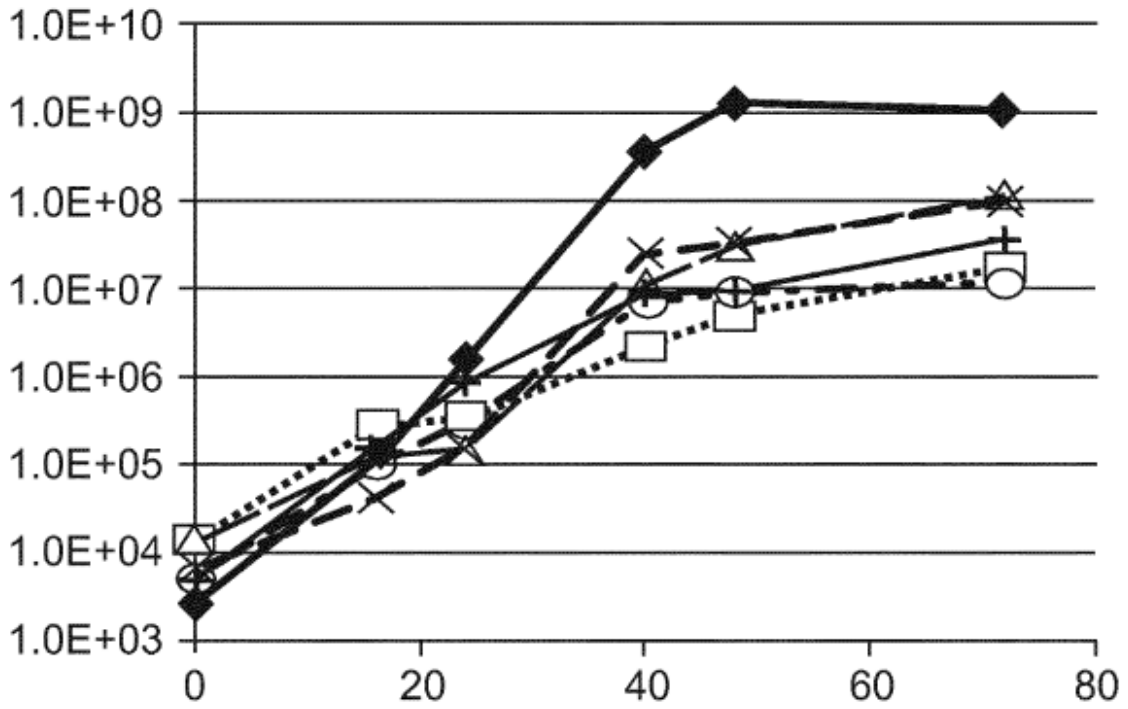


FIG. 13

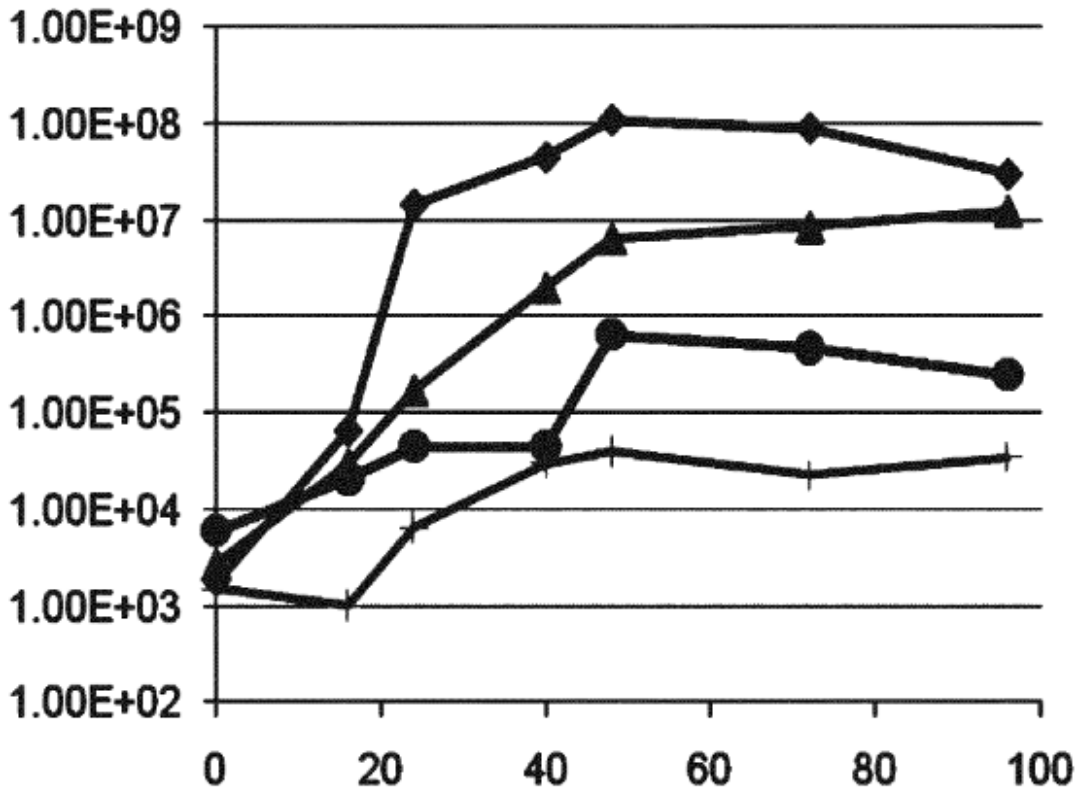


FIG. 14(A)

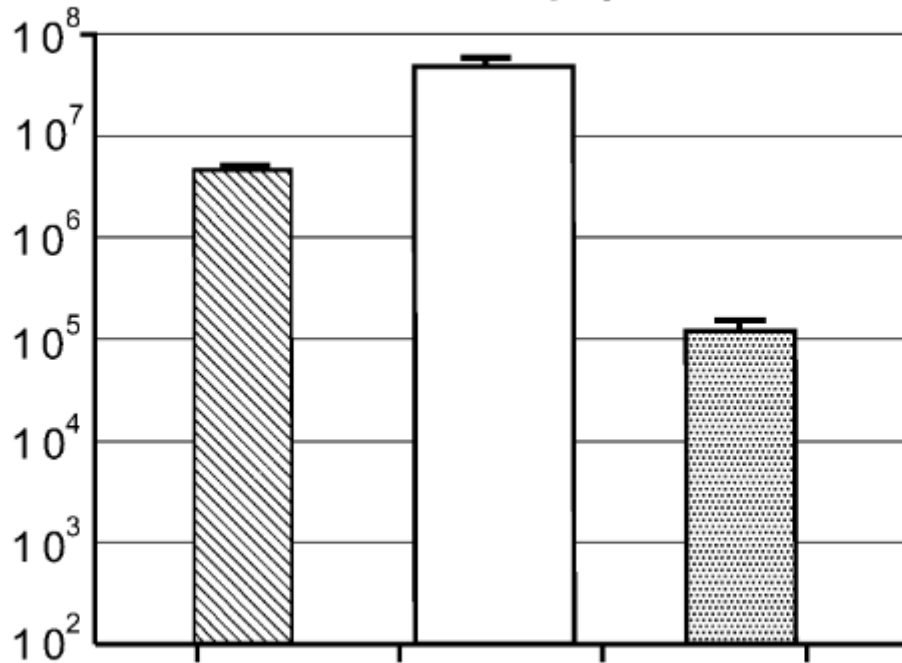


FIG. 14(B)

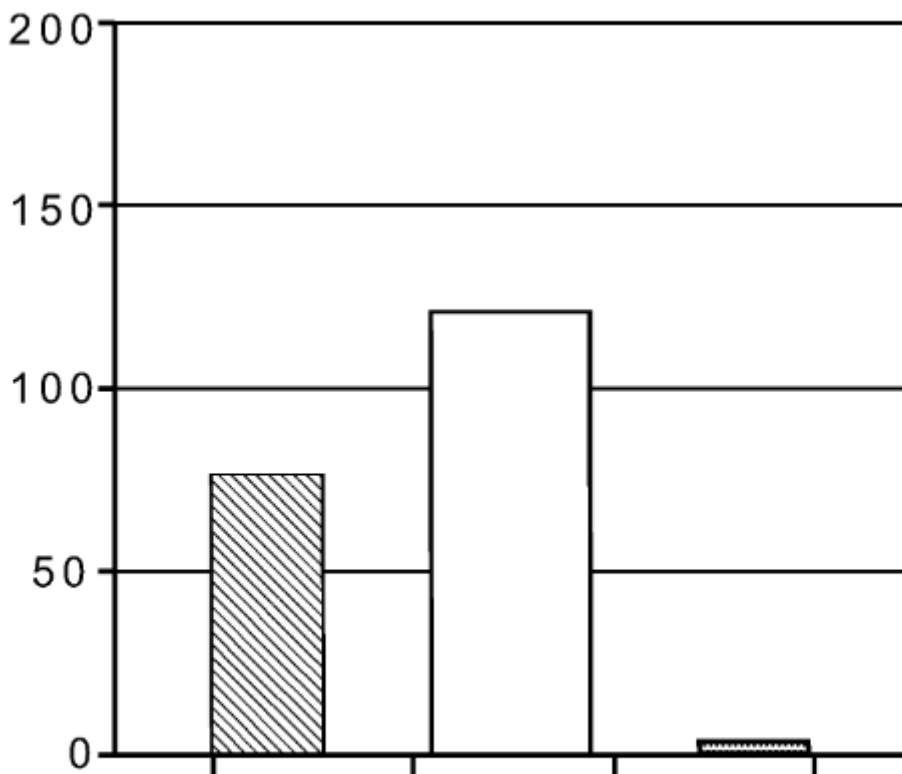


FIG. 14(C)

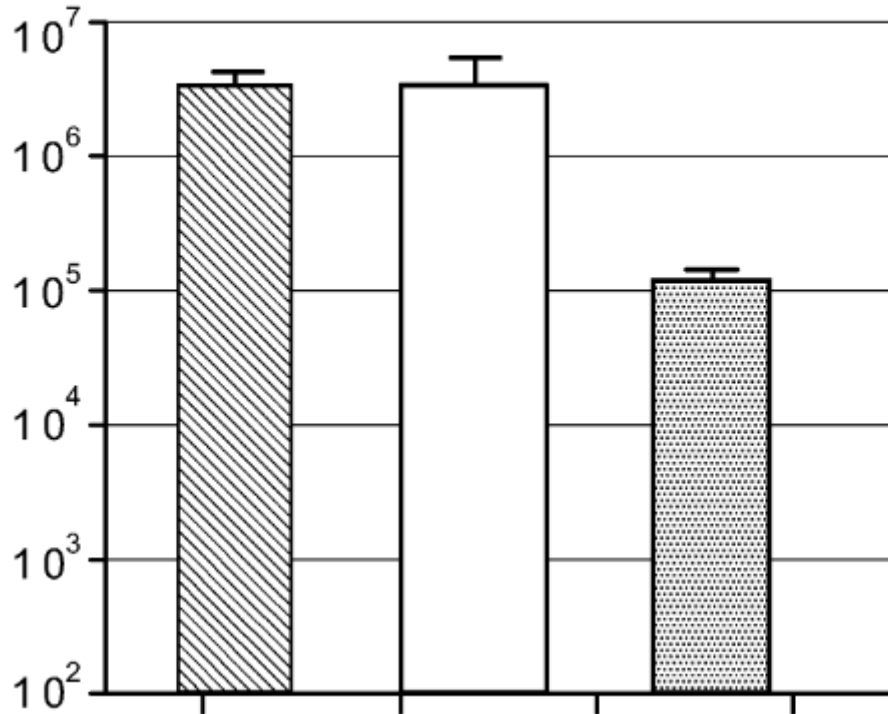
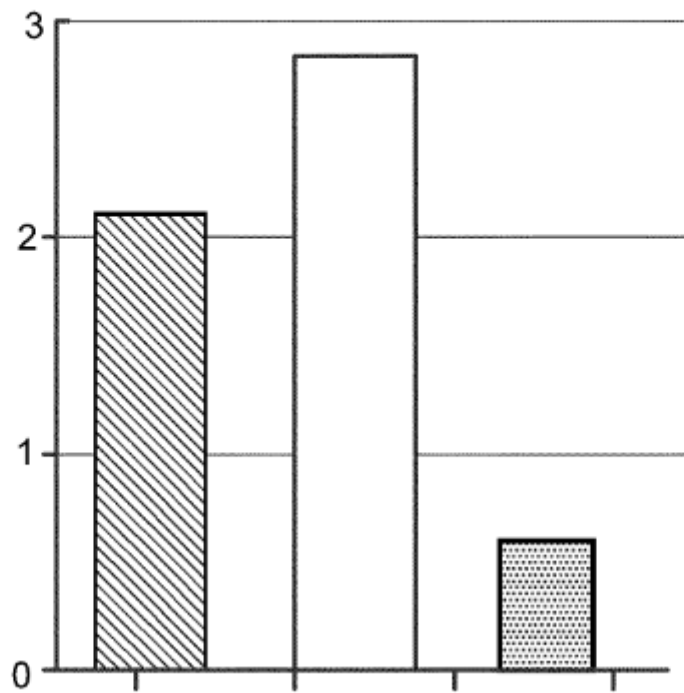


FIG. 14(D)



105p30	1	mslltevetylvlsivpsgplkaeiaqrlenvfagkntdlealmewlkt	50
A/NC/20/66	1	mslltevetylvlsivpsgplkaeiaqrlenvfagkntdlealmewlkt	50
105p30	51	ilspltkgilgfvftltvpserglqrrrfvqnalngngdpnndravkly	100
A/NC/20/66	51	ilspltkgilgfvftltvpserglqrrrfvqnalngngdpnndravkly	100
105p30	101	rk1kreitfhgakeia1sysagalascmgliynrmgavttesafglicat	150
A/NC/20/66	101	rk1kreitfhgakeia1sysagalascmgliynrmgavttesafglicat	150
105p30	151	ceqiadsqhkshrqmvtttnplirhenrmvlasttakameqmagssseqaa	200
A/NC/20/66	151	ceqiadsqhkshrqmvtttnplirhenrmvlasttakameqmagssseqaa	200
105p30	201	eamevasqarqmvqamraigtphssstg1kndllenlqayqkrmgvqmqr	250
A/NC/20/66	201	eamevasqarqmvqamraigtphssstg1kndllenlqayqkrmgvqmqr	250
105p30	251	fk	252
A/NC/20/66	251	fk	252

FIG. 15