

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 051**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/US2012/052368**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12761841 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2747778**

54 Título: **Virus de la gripe con segmento génico PB2 mutante como vacunas vivas atenuadas**

30 Prioridad:

26.08.2011 US 201161527935 P

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

16.02.2018

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
P.O. Box 7365
Madison WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**KAWAOKA, YOSHIHIRO;
NEUMANN, GABRIELE y
OZAWA, MAKOTO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 655 051 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Virus de la gripe con segmento génico PB2 mutante como vacunas vivas atenuadas

Antecedentes

5 Los virus de la gripe provocan epidemias globales anuales y pandemias esporádicas. Los virus A de la gripe causan
 10 anualmente epidemias caracterizadas por una enfermedad respiratoria contagiosa, fiebre de moderada a intensa y
 en algunos casos la muerte (Palese & Shaw, 2007). La investigación en vacunas y antiviral curativa enfocada en la
 prevención y control de este virus potencialmente fatal está justificada para evitar considerables cargas en los
 sistemas sanitarios y la economía global. La intensiva investigación ha llevado al descubrimiento de intervenciones
 terapéuticas para combatir las infecciones de gripe; no obstante, debido a la tendencia al error de la polimerasa, la
 hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) del virus, las proteínas virales de la gripe están sujetas a mutaciones
 puntuales, conocidas como deriva antigénica o genética (Lin et al., 2004), que permiten al virus escapar a las
 respuestas inmunitarias del huésped, o producir algunos tipos de resistencia a los fármacos (Moss et al., 2010). La
 vacunación es uno de los medios más efectivos de prevención de la morbilidad y la mortalidad asociadas a la gripe.

15 En las intervenciones terapéuticas y profilácticas disponibles actualmente se incluyen dos tipos de vacunas (es decir,
 vacunas inactivadas y vivas) y dos clases de antivirales (es decir, los bloqueadores del canal del ión M2, como la
 amantadina y la rimantadina, y los inhibidores de la neuroaminidasa (NA), como oseltamivir y zanamivir)(Davies et
 al., 1964; Hayden, 2001). No obstante, la gripe estacional es una enfermedad contagiosa con uno de los mayores
 impactos sobre la epidemiología de la salud pública. Además, durante la temporada de gripe 2009-2010, una nueva
 cepa del virus A de la gripe, el virus pandémico 2009 H1N, emergió y se extendió por todo el mundo, causando la
 20 primera pandemia de gripe en 40 años con un considerable impacto en la salud y la economía mundial
 (<http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.htm>). En los Estados Enlazados solamente, se calcularon unos 61
 millones de casos de H1N1 registrados, incluyendo 274 000 hospitalizaciones y 12 470 muertes
 (<http://www.cdc.gov/flu/about/season/index.htm>).

25 Debido a su sistema inmune subdesarrollado o alterado, los individuos jóvenes, mayores o inmunodeprimidos
 resultan especialmente susceptibles a enfermedades infecciosas como la gripe. Varios estudios realizados en Japón
 han sugerido que elevadas tasas de vacunación de la gripe entre niños en edad escolar proporcionaba protección,
 reducía efectos sobre la comunidad, y también la incidencia y la mortalidad de las personas de más edad por
 infección de gripe; el estudio de 2001 informaba sobre la prevención de aproximadamente de 37 000 a 49 000
 muertes por año, y el aumento de índices excesivos de mortalidad cuando se interrumpía la vacunación de los
 30 escolares (Reichert et al., 2001).

Las vacunas inactivadas de la gripe actualmente disponibles van asociadas a cortos periodos de protección y una
 eficacia limitada, especialmente en niños pequeños y ancianos. Debido a su incapacidad para provocar
 efectivamente inmunidad mediada por células, las vacunas inactivadas son en general menos inmunogénicas, y por
 lo mismo menos potentes, que las vacunas vivas atenuadas, que están aprobadas para su uso en un número
 35 limitado de países, como los Estados Enlazados. Los virus vivos atenuados administrados intranasalmente están
 considerados superiores a las vacunas inactivadas para niños, porque provocan una fuerte inmunidad mucosal y
 humoral, y respuestas inmunes celulares unidas a una protección eficaz duradera (Cox et al., 2004). No obstante,
 las vacunas vivas atenuadas están autorizadas actualmente solo para individuos de 2 a 49 años, que no padezcan
 enfermedades crónicas y no mujeres embarazadas o individuos inmunodeprimidos, aunque los virus vivos
 40 atenuados autorizados son considerados seguros y estables respecto al riesgo subyacente de emergencia de virus
 revertientes.

Las vacunas inactivadas administradas parenteralmente van asociadas también a reacciones adversas o
 anafilácticas debido a la propagación del virus en huevos embrionados, y la propensión de las proteínas del huevo
 de esas vacunas a producir alergias, provocando reacciones de hipersensibilidad en huéspedes susceptibles. Un
 45 requisito previo para una propagación con éxito de una vacuna basada en huevo es la selección de variantes
 adaptadas a huevos de gallina embrionados; un criterio que puede no coincidir ya con la antigenicidad de los virus
 circulantes. Otra complicación puede ser la posible reducción de las existencias de pollos teniendo en cuenta un
 posible brote zoonótico de gripe aviar pandémica, que podría poner en peligro la producción en masa de vacunas.

La vacuna viva atenuada de la gripe (Live attenuated influenza vaccine, LAIV) derivó originalmente de la adaptación
 50 en frío de una cepa de gripe tipo A (A/Ann Arbor/6/60 H2N2) y una cepa tipo B (B/Ann Arbor/1/66) por pasos
 seriados a temperaturas secuencialmente más bajas en células primarias de riñón de pollo sin patógenos
 específicas (Maassab et al., 1968). Durante este proceso, los virus adquirieron múltiples mutaciones en segmentos
 génicos proteicos internos (es decir, genes codificando proteínas no glicosiladas "internas") que producían el
 fenotipo adaptado al frío (ca), sensible a la temperatura (TS) y atenuado (att) de los virus donantes maestros (master
 55 donor viruses, MDVs). Los MDVs representan la espina dorsal genética de la LAIV que se actualiza anualmente con
 genes de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de virus de la gripe contemporáneos para producir la
 formulación trivalente anual. Así, cada una de las tres cepas de virus de la gripe es un virus genéticamente
 recombinante 6:2, conteniendo seis segmentos génicos internos de MDVs ca, ts, y att, y dos segmentos génicos
 (codificando las proteínas HA y NA) de un tipo salvaje de virus de la gripe que selecciona anualmente la
 60 Organización Mundial de la Salud y el U.S. Public Health Service.

Como múltiples loci en varios genes controlan los fenotipos ca, ts, y att de los virus de vacunas LAIV, es altamente improbable que la LAIV pierda esos fenotipos como resultado de una reversión (Kemble et al., 2003; Murphy et al., 2002). Dada la tasa de error de 10^{-4} a 10^{-5} incorporaciones defectuosas por posición de nucleótido durante la replicación del virus de la gripe, y el hecho de que por lo menos cinco mutaciones puntuales son responsables de las propiedades atenuadas de cada MDV (Murphy et al., 2002; Smith et al., 1987), la probabilidad de que un virus de vacuna LAIV revierta a gripe tipo salvaje, con mutaciones en los cinco loci atenuantes, sería de una en por lo menos 10^{20} ciclos de replicación. En un estudio de 135 cepas de vacuna recuperadas de niños pequeños vacunados, no se observó evidencia de reversión (Vesikari et al., 2006).

La primera LAIV administrada nasalmente fue autorizada para su uso en los Estados Enlazados en 2003, comercializada en los Estados Enlazados como FluMist® [Vacuna de Virus Vivo de la Gripe, Intranasal]). Aunque los virus de vacunas LAIV se generaron originalmente utilizando recombinación clásica, en 2008 el proceso cambió a tecnología genética inversa. Los virus recombinados genéticamente son preparados utilizando tecnología genética inversa en cultivo celular, una técnica en la que los virus de la gripe pueden ser generados a partir de plásmidos de ADN conteniendo genes de gripe. Tres cepas de vacuna se formulan juntas para producir una vacuna LAIV trivalente en sprays de dosis única. La LAIV intranasal está actualmente autorizada en los Estados Enlazados para su uso en individuos de 2 a 49 años de edad.

Los virus vivos atenuados son considerados superiores a las vacunas inactivadas, debido a su capacidad para provocar respuestas inmunes tanto humorales como celulares, y por ello proporcionar mayor protección en lactantes y niños pequeños. En particular, las vacunas vivas atenuadas administradas intranasalmente provocan fuertes respuestas de inmunidad mucosal y celular, unidas a una eficacia protectora de mayor duración (Cox et al., 2004). Los virus de las vacunas de la gripe vivas atenuadas se replican básicamente en las células epiteliales ciliadas de la mucosa nasofaríngea, para provocar respuestas (vía inmunoglobulina IgA de la mucosa, anticuerpos séricos IgG e inmunidad celular), pero los virus de LAIV no se replican bien a las temperaturas superiores que se dan en las vías inferiores y el pulmón (Murphy et al., 2002; Gruber et al., 2002). Además, la alternativa basada en células ofrece varias ventajas (ej., células empleadas para amplificar el virus tras su generación utilizando genética inversa) respecto al sistema convencional de propagación de vacuna basada en huevos. Los estudios con vacunas basadas en células han demostrado ventajas significativas sobre la vacunología a base de huevo, en cuanto constituyen una alternativa más viable económicamente, rápida y con menos trabajo manual, cuya capacidad de producción puede ser incrementada rápidamente en respuesta a la demanda, en el contexto de una pandemia. Además, la ingeniería genética de los virus mediante tecnologías basadas en ADN recombinante permite la explotación de un parasitismo genético del virus, mientras desarma su potencia patógena. Se puede hacer que los virus sean incapaces de replicarse, y no patógenos o manipulados para introducir y expresar un gen extraño en un huésped receptivo.

Resumen de la invención

La invención viene expuesta en las reivindicaciones anexas a esta descripción. La divulgación proporciona un virus de la gripe recombinante contenido biológicamente, que resulta útil para generar una vacuna multivalente, y satisface los requisitos de seguridad respecto a patogenicidad o reversión, virus que opcionalmente puede expresar de forma estable un gen extraño, y así puede ser rastreado de forma efectiva y evaluar fácilmente su replicación. Como se divulga aquí más adelante, se generó un virus de la gripe PB2-knock-out (PB2-KO) que contiene un gen reporter, ej. un gen de proteína fluorescente, como un gen GFP o un gen de luciferasa, en la región codificante de su ARN PB2 viral (vARN), donde la replicación del virus estaba restringida a una línea celular que expresaba establemente la proteína PB2. El vARN PB2 codificante de gen reporter fue incorporado de forma estable en el virus de progenie durante la replicación en células con expresión PB2, y el gen reporter fue expresado en células infectadas por virus sin evidencia de recombinación entre el vARN PB2 recombinante y la proteína mARN PB2. Por otra parte, los genes HA y NA de distintas cepas de virus fueron fácilmente acomodados por el virus PB2-KO. Se utilizó el virus PB2-KO para establecer un ensayo mejorado de cribado de anticuerpos neutralizantes contra los virus de la gripe, utilizando la expresión de gen reporter como indicador de infección vírica, en lugar de observar el efecto citopático. Estos resultados indican que el virus PB2-KO tiene potencial para ser una valiosa herramienta en la investigación virológica básica y aplicada, y que puede ser aplicable a otros virus knock-out del gen polimerasa, ej., virus PA-KO o virus PB1-KO.

En una realización, la divulgación proporciona un virus de la gripe aislado infeccioso, biológicamente contenido, que tiene un segmento génico viral que no comprende secuencias de ácido nucleico contiguas correspondientes a las que codifican PB2 (un segmento génico viral PB2 mutante), una proteína que es una de las subunidades de polimerasa ARN viral, y es esencial para la replicación del virus. Para preparar tal virus en cultivo celular, se emplea una línea celular que expresa PB2 en trans en combinación con vectores para la producción de vARN de virus de la gripe, pero no una para un segmento génico viral PB1 tipo salvaje, y en una realización vectores para la producción de proteína de mARN de virus de la gripe. El virus resultante no es competente para expresar PB2 tras la infección de células que no expresan PB2 en trans, o no están infectadas con virus helper, lo que proporciona un virus "contenido biológicamente". No obstante, los viriones producidos a partir de células que expresan PB2 en trans contienen PB2. Dicho virus de la gripe infeccioso, biológicamente contenido, con un segmento génico viral PB2 mutante, fue generado en múltiples líneas celulares que expresan PB2 en trans, tales como células embrionarias de riñón humanas 293 con expresión PB2 (293), células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), o células de riñón caninas Madin-Darby (MDCK) con sobreexpresión de 2,6-sialiltransferasa (células AX4), con el

resultado de elevados títulos virales de cómo mínimo 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 PFU/ml (PFU, Plaque Forming Units) o más.

La vacunación es el medio primario de profilaxis contra la infección por gripe. Como se expone aquí, el virus PB2-KO se replicó hasta títulos elevados ($>10^8$ PFU/ml) en células con expresión PB2, pero no en células normales no infectadas (células que no expresan PB2 en trans), acomodó genes de HA y NA de un virus de la gripe heterólogo, incorporó de forma estable un gen reporter en viriones PB2-KO de progenie que fue retenido mediante pasos secuenciales, y fue atenuado en ratones, sugiriendo su potencial como vacuna. Su capacidad de expresar antígenos y su candidatura como vacuna fueron comprobadas en un modelo murino. Niveles significativamente más altos de anticuerpos IgG e IgA fueron inducidos en suero, lavados nasales y muestras de lavados broncoalveolares de ratones inmunizados con solamente una dosis de virus PB2-KO (GFP), en comparación con vacunas de la gripe inactivadas. Todos los ratones tratados con virus PB2-KO sobrevivieron a la exposición a varias dosis letales de PR8. La replicación limitada de ese virus ocurre in vivo, ya que el virus producido en células que expresan PB2 en trans lleva consigo una pequeña cantidad de proteína PB2 a la célula huésped que es posteriormente infectada (como una célula huésped que no expresa o comprende PB2, o comprende PB2 vARN tipo salvaje), permitiendo así que se produzca una cantidad limitada (ej. una ronda o así) de replicación, pero sin un proceso infeccioso (por ejemplo, ampliación de los títulos virales de alrededor de 1000). La replicación limitada de los virus KO in vivo permite una respuesta inmune que proporciona una respuesta inmune más fuerte de la inducida por las vacunas de la gripe inactivadas convencionales. Es de destacar que los ratones inmunizados producen anticuerpos contra el reporter, como determina un ensayo de inmunofluorescencia, sugiriendo que el virus PB2-KO tiene la potencia de una vacuna multivalente. El PB2-KO mostró unos perfiles de seguridad y eficacia similares o mejores al ser comparado con controles, lo que resulta prometedor para combatir la infección por el virus de la gripe.

En una realización, la divulgación proporciona un virus de la gripe aislado infeccioso, recombinante y biológicamente contenido, comprendiendo 8 segmentos génicos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y M2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2). En otra realización, la invención proporciona un virus de la gripe aislado infeccioso, biológicamente contenido, recombinante, comprendiendo 8 segmentos génicos incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA (NA y NB), un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y BM2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2). En una realización, el virus de la gripe infeccioso, biológicamente contenido y recombinante, tiene un segmento génico viral M para M1 y M2. En una realización, el virus de la gripe infeccioso, biológicamente contenido recombinante tiene un segmento génico viral NA para NB y NA. En una realización, el virus de la gripe infeccioso, biológicamente contenido y recombinante tiene un segmento génico HEF.

En aún otra realización, la divulgación proporciona un virus de la gripe aislado infeccioso, biológicamente contenido y recombinante, comprendiendo segmentos génicos que incluyen un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M, un segmento génico viral NS (para NS1 y NS2), y un segmento génico viral HEF. En una realización, el segmento génico viral PB2 mutante incluye secuencias de incorporación codificantes y no codificantes virales PB2 5' y/o 3', opcionalmente flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondientes a secuencias codificando un PB2 funcional. El marco de lectura abierto PB2 en el segmento génico viral PB2 mutante puede ser sustituido o interrumpido por una secuencia de nucleótidos heteróloga, como una que sea fácilmente detectable tras transfección o infección, ej., un gen reporter como un gen GFP o un gen luciferasa, ej., un gen luciferasa Renilla, o un gen codificante de un antígeno procedente de un patógeno. En una realización, la región codificante PB2 del segmento génico viral PB2 mutante puede incluir mutaciones tales como inserciones o supresiones de uno o más nucleótidos, o los que resultan en una o más sustituciones de aminoácidos, o un codón de parada, o cualquier combinación de lo anterior, que produce una secuencia codificante PB2 no funcional. En una realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga es de aproximadamente 30 a aproximadamente 5000, ej., aproximadamente de 100 a aproximadamente 4500, o aproximadamente de 500 a aproximadamente 4000 nucleótidos de longitud.

Los virus infecciosos, biológicamente contenidos de la invención pueden así ser utilizados como vacunas de la gripe, para inducir una respuesta inmunogénica en un huésped, sin el riesgo de síntomas asociados a una infección, o reversión genética de una forma atenuada a otra plenamente infecciosa. Los virus infecciosos biológicamente contenidos de la invención pueden provocar una mejor respuesta inmune que los virus inactivados químicamente, porque son virus vivos, pero como son biológicamente contenidos, los virus de la invención es probable que no causen síntomas de la enfermedad, lo que constituye con frecuencia un problema con las vacunas vivas atenuadas. Y en contraste con el uso de partículas similares a virus (virus-like particles, VLPs), que no son replicativas, los virus KO de la invención contienen ARN, que es un adyuvante que potencia la respuesta inmune del huésped contra el virus. Las propiedades de un virus de la gripe PB2-KO de la invención fueron sorprendentes, teniendo en cuenta que un virus similar, un virus M2 deficiente que carece de la transmembrana y los dominios citoplasmáticos de M2 (ver, Watanabe et al., *J. Virol.*, 83:5944 (2009)) produjo títulos bajos, ej. 10^2 - 10^3 PFU/ml, en ausencia de M2 suministrado en trans, y fue así de replicación defectuosa pero no biológicamente contenido.

En una realización, la divulgación proporciona un virus de la gripe aislado, recombinante infeccioso, biológicamente contenido, que comprende 7 segmentos génicos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M, y un segmento génico viral NS1 y NS2, es decir, el virus carece de segmento génico viral PB2.

5 En una realización, en el virus de la gripe PB2-KO de 8 segmentos con un segmento génico viral PB2 mutante, el segmento génico viral PB2 mutante tiene una supresión de secuencias codificantes PB2, una supresión de secuencias codificantes PB2, y una inserción de secuencias de nucleótidos heteróloga, o una inserción de secuencias de nucleótidos heteróloga que interrumpe las secuencias de codificación PB2. Ese virus replica in vitro cuando se suministra PB2 en trans a títulos que son sustancialmente los mismos o como máximo 10, 100 o 1000 veces menores que un virus de la gripe tipo salvaje correspondiente, pero es atenuado in vivo o in vitro en ausencia de PB2 suministrado en trans. En una realización, la supresión de la secuencias codificantes de PB2 incluye 1 o más nucleótidos contiguos o no contiguos de PB2, y puede incluir la supresión de toda la región codificante, ej., una región codificando 759 aminoácidos. En una realización, la supresión incluye por lo menos un 10%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95% y hasta un 99%, o un valor numérico porcentual que es cualquier entero entre 10 y 99, pero no todos, de la región codificante PB2. En una realización, la supresión de las secuencias codificantes de PB2 no incluye la supresión de secuencias codificantes 5' o 3' que potencia la incorporación del gen viral resultante en viriones, ej., secuencias contiguas a secuencias PB2 no codificantes 3' o 5', relativas a un segmento génico viral recombinante con solamente secuencias de incorporación PB2 no codificantes.

20 En una realización, el segmento génico BP2 mutante puede comprender una inserción de uno o más nucleótidos, ej. los que resultan en un desplazamiento del marco, de forma que no puede expresarse PB2 funcional. En una realización, la inserción no comprende la alteración de secuencias codificantes 5' o 3' que aumentan la incorporación del segmento génico en viriones relativos a un segmento génico recombinante con solamente secuencias de incorporación PB2 no codificantes.

25 En una realización, el segmento génico viral PB2 mutante puede comprender por lo menos una mutación lo que resulta en por lo menos una sustitución de aminoácido relativo a una proteína PB2 tipo salvaje correspondiente, ej., una mutación que elimina o sustituye el codón iniciador, o que introduce a uno o más codones parada en la región codificante, de forma que no se puede expresar PB2 funcional de ese segmento génico viral tras infección. En una realización, la sustitución, eliminación o reemplazo del codón iniciador, o la introducción de un más codones parada en el marco de lectura para PB2, no incluye la alteración de las secuencias codificantes 5' o 3' que fomenta la incorporación del segmento génico en viriones relativos a un segmento génico recombinante con solamente secuencias de incorporación PB2 no codificantes.

35 En una realización de la divulgación la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar una proteína heteróloga (una proteína viral de no gripe, como una glicoproteína o una proteína específica citosólica, nuclear o mitocondrial, o cualquier proteína antigénica, como un antígeno de un patógeno microbiano), que puede conferir un fenotipo detectable. En una realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede fusionarse a porciones truncadas de secuencias codificantes de PB2, ej., las correspondientes a secuencias de incorporación codificantes PB2 5' o 3', formando opcionalmente una proteína quimérica. En una realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga sustituye o es introducida a secuencias en el segmento génico viral correspondiente a la región codificante para este segmento, de forma que no interrumpe las secuencias de incorporación en la región de codificación del segmento génico. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede ir flanqueada por aproximadamente 3 a aproximadamente 400 nucleótidos de la región de codificación PB2 5' y/o 3' adyacente a la secuencia no codificante. En una realización, las secuencias de incorporación PB2 3' corresponden a nucleótidos 3 a 400, nucleótidos 3 a 300, nucleótidos 3 a 100, nucleótidos 3 a 50, o cualquier entero entre 3 y 400, de la región de codificación PB2 terminal N y/o terminal C. En una realización, tras la infección de una célula huésped con el virus PB2-KO contenido biológicamente, se produce una proteína heteróloga que es una fusión con el N-terminal y/o el C-terminal de los residuos restantes de la proteína PB2 suprimida.

45 Se introduce un vector para la producción de vARN del segmento génico PB2 mutante en una célula junto con un vector o vectores para la producción de vARN para PA vARN, PB1 vARN, NP vARN, HA vARN, NA vARN, M vARN, y NS (NS1 y/o NS2) vARN, y vectores para la producción de mARN (proteína) para uno o más de PA, PB1, PB2, y NP, o vectores para la producción de mARN de hasta tres de PA, PB1, PB2, y NP, donde la célula expresa de forma estable la proteína(s) viral restante, y opcionalmente expresa HA, NA, M, ej., M1 y M2, NS1 y/o NS2. El vARN para el segmento génico PB2 mutante puede ser incorporado a viriones con una eficiencia que es por lo menos un 1 %, 5%, 10%, o 30%, o por lo menos 50%, de la de un vARN PB2 tipo salvaje correspondiente.

50 En una realización, el virus de la gripe de la invención produce inmunidad tanto sistémica como de la mucosa en el portal primario de infección. La divulgación proporciona una vacuna viva atenuada o una composición inmunogénica comprendiendo el virus contenido biológicamente recombinante de la invención, y un método de utilización de la vacuna o composición inmunogénica para inmunizar a un vertebrado, ej., un ave o un mamífero, como un ser humano, o inducir una respuesta inmune en un vertebrado, respectivamente. En una realización, la composición o vacuna está formulada para la administración intranasal. En una realización, el virus biológicamente contenido recombinante de una vacuna comprende un segmento génico HA para HA de virus A de la gripe, ej. H1, H2, H3, H5, H7, o H9 HA. En una realización, la HA en el virus biológicamente contenido recombinante de una vacuna está modificado en el sitio de escisión HA. En una realización, la vacuna comprende por lo menos una cepa de virus de la

gripe que es distinta del virus biológicamente contenido recombinante de la invención, por ejemplo, la vacuna comprende dos o tres virus de la gripe distintos.

La divulgación proporciona diversos vectores para preparar un virus A de la gripe A infeccioso, biológicamente contenido, con uno o más vectores incluyendo cassettes de transcripción para la producción de vARN, y cassettes de transcripción para la producción de mARN. Las cassettes de transcripción para la producción de vARN son cassettes de transcripción que comprenden un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a un PA ADN de virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que da lugar a terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a un ADN PB1 de virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a un ADN PB2 del virus de la gripe mutante en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a un ADN HA de virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN NA de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico enlazado a una secuencia de terminación de la transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, único operativamente a ADN NP de virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN M de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción de transcripción Poll, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN NS (NS1 y NS2) de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll. El ADN PB2 mutante incluye secuencias de incorporación 5' y 3' flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondientes a secuencias que codifican un PB2 funcional. Las cassettes de transcripción para la producción de mARN son cassettes de transcripción que comprenden un promotor Pol 11 enlazado operativamente a una región codificante de ADN para virus de la gripe PA, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Pol 11, una cassette de transcripción que comprende un promotor Pol 11 enlazado operativamente a una región codificante de ADN para virus de la gripe PB1 enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Pol 11, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Pol 11 enlazado operativamente a una región de ADN codificante para virus de la gripe NP enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Pol 11, y opcionalmente una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Pol 11 enlazado operativamente a una región ADN codificante para virus de la gripe, uno o más de PB2, HA, NA, NS1, NS2, M1 y/o M2 enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Poll I. Se proporciona además una composición con los vectores, y un método de empleo de los vectores.

La divulgación proporciona también diversos vectores para preparar un virus de la gripe B infeccioso, biológicamente contenido, de 8 segmentos, con uno o más vectores que incluyen cassettes de transcripción para la producción de vARN, y cassettes de transcripción para la producción de mARN. Las cassettes de transcripción para la producción de vARN son cassettes de transcripción que comprenden un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN PA de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN PB1 de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN PB2 de un virus de la gripe mutante en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN HA de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de la transcripción que resulta en

terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN NA y NB de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a DNA NP del virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN M de un virus de la gripe, en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares al virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll, enlazado operativamente a ADN NS (NS1 y NS2) de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Poll. El ADN PB2 mutante incluye secuencias de incorporación 5' y 3', opcionalmente flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondiendo a secuencias que codifiquen un PB2 funcional. Las cassettes de transcripción para la producción de mARN son cassettes de transcripción comprendiendo un promotor Poll enlazado operativamente a una región de ADN codificante para virus de la gripe PA, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette comprendiendo un promotor Poll enlazado operativamente a una región de ADN codificante para virus de la gripe PB1, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Poll, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll, enlazado operativamente a una región de ADN codificante para virus de la gripe NP, enlazado a una secuencia de transcripción Poll, y opcionalmente una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll enlazado operativamente a una región de ADN codificante para virus de la gripe uno o más de PB2, HA, NA, NS1, NS2, M1 y/o BM2, enlazado a una secuencia de terminación de transcripción Poll. Se proporciona además una composición con los vectores y un método de empleo de los mismos.

En una realización, el promotor en un vector vARN incluye, pero sin limitación, un promotor de ARN polimerasa (Poll), ej., un promotor de ARN humano Poll, un promotor de ARN polimerasa II (Poll), un promotor de ARN polimerasa III, un promotor SP6, un promotor T7, o un promotor T3. En una realización, uno o más vectores de vARN incluyen un promotor Pol 11 y secuencias de ribozima 5' en secuencias de virus de la gripe, y las mismas o distintas secuencias de ribozima 3' en las secuencias del virus de la gripe. En una realización, el segmento génico PB2 mutante está en un vector y está unido operativamente a un promotor, incluyendo, pero sin limitación, un promotor de ARN Poll, ej., un promotor de ARN Poll humano, un promotor de ARN Poll, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor SP6, un promotor T7, o un promotor T3. En una realización, los vectores de vARN incluyen una secuencia de terminación de transcripción incluyendo, pero sin limitación, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una secuencia de terminación de transcripción Pol 11, o una secuencia de terminación de transcripción Pol 111, o uno o más ribozimas.

Varios vectores de la divulgación pueden estar físicamente unidos, o cada vector puede estar presente en un plásmido individual u otro, ej., vehículo de suministro de ácido nucleico lineal. En una realización, cada vector de producción de vARN está en un plásmido distinto. En una realización, cada vector de producción de mARN está en un plásmido distinto. En una realización, uno o más vectores para la producción de vARN están en el mismo plásmido (ver ej. solicitud USA publicada N° 20060166321).

En una realización, uno o más vectores para la producción de mARN están en el mismo plásmido (ver ej. solicitud USA publicada N° 2006/0166321). En una realización, los vectores de vARN empleados en el método están en un plásmido o en dos o tres plásmidos distintos. En una realización, los vectores de mARN para PA, PB1, y NP, y opcionalmente PB2, empleados en el método, están en un plásmido o en dos o tres plásmidos distintos.

También se proporciona una célula huésped comprendiendo un vector con expresión PB2, ej., PB2 de PR8 u otra cepa maestra de vacuna. En una realización, el PB2 tiene por lo menos una identidad del 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con PB2 codificado por SEQ ID NO: 3. En una realización, la célula huésped es transducida con un vector viral, ej., un vector que es mantenido establemente en la célula como un episoma, o integrado en un cromosoma, como un vector lentiviral o retroviral. En una realización, la célula huésped incluye además uno o más vectores que incluyen cassettes de transcripción para la producción de vRNA transitorio, y cassettes de transcripción para la producción de mARN transitorio. Las cassettes de transcripción para la producción de vARN son cassettes de transcripción que comprenden un promotor para la producción de ARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN PA de virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll unido operativamente a ADN PB1 de virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico, unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN PB2 de virus de la gripe mutante, en una orientación para la producción de ARN viral genómico unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a

virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN HA de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una

5 secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN NA de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una

10 secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN NP de virus de la gripe, en una orientación para la producción de ARN viral genómico unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN M de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una

15 secuencia de terminación de transcripción Poll, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor para la producción de vARN, ej., un promotor Poll, unido operativamente a ADN NS (NS1 y NS2) de un virus de la gripe en una orientación para la producción de ARN viral genómico unido a una secuencia de terminación de transcripción que resulta en terminales de vARN similares a virus de la gripe, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción Poll. El ADN PB2 mutante incluye secuencias de incorporación 5' y 3', opcionalmente flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondiendo a secuencias que codifican un PB2 funcional. Las cassettes de transcripción para la producción de mARN son cassettes de transcripción que comprenden un promotor PolIII, unido operativamente a una región de ADN codificante para PA de virus de la gripe, unido a una secuencia de terminación de transcripción PolIII, una cassette de transcripción comprendiendo un

20 promotor PolIII unido operativamente a una región de ADN codificante para PB1 de virus de la gripe, unido a una secuencia de terminación de transcripción PolIII, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor PolIII unido operativamente a una región de ADN codificante para NP de virus de la gripe, unido a una secuencia de terminación de transcripción PolIII. La célula huésped no incluye secuencias que correspondan a secuencias codificantes PB2 para la producción de vARN de un segmento génico viral PB2 de tipo salvaje.

25 La divulgación proporciona un método para preparar virus de la gripe, ej., utilizando una célula huésped de la invención. El método comprende contactar una célula con diversos vectores de la divulgación, ej., secuencial o simultáneamente, en una cantidad efectiva para producir virus de la gripe infecciosos. La divulgación incluye también aislar virus de una célula contactada con los diversos vectores. Así, la divulgación proporciona además virus aislados, así como una célula huésped contactada con virus de la invención. En otra realización, la divulgación

30 incluye contactar la célula con uno o más vectores, vectores de producción de vARN o de proteínas, antes de otros vectores, de producción de vARN o proteínas.

35 En una realización, la divulgación proporciona un método para preparar un virus de la gripe recombinante comprendiendo un segmento génico viral PB2 mutante. El método comprende contactar una célula huésped con diversos vectores de gripe, incluyendo un vector que comprende la secuencia de segmento génico PB2 mutante, para producir virus recombinante. Por ejemplo, la célula huésped es contactada con vectores para la producción de

40 vARN, incluyendo un vector que comprende un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN PA de un virus de la gripe, unido a una secuencia de terminación de transcripción, un vector comprendiendo un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN PB1 de un virus de la gripe, unido a una secuencia de terminación de transcripción, un vector que comprende un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN PB2 de un virus de la gripe mutante, unido a una secuencia de terminación de transcripción, un vector comprendiendo un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN HA de un virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de transcripción, un vector comprendiendo un promotor para la producción de vARN, unido operativamente a ADN NP de un virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de transcripción, un vector comprendiendo un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN

45 NA de un virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de transcripción, un vector comprendiendo un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN M de un virus de la gripe, unido a una secuencia de terminación de transcripción, y un vector comprendiendo un promotor para la producción de vARN unido operativamente a ADN NS (NS1 y NS2), de un virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de transcripción, donde el ADN PB2 mutante está en una orientación para la producción de vARN genómico e incluye secuencias de incorporación 5' y 3', opcionalmente flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondientes a las de un PB2 funcional, y vectores para la producción de mARN incluyendo un vector que comprende un promotor unido operativamente a un segmento de ADN que codifica PA de virus de la gripe, un vector comprendiendo un promotor unido operativamente a un segmento de ADN codificando PB1 de virus de la gripe, un vector comprendiendo un promotor unido operativamente a un segmento de ADN codificando NP de virus de la gripe, donde la célula no es contactada por secuencias correspondientes a secuencias codificantes de PB2 para la producción de vARN. Opcionalmente, la célula huésped es contactada con un vector que comprende un promotor unido operativamente a un segmento de ADN que codifica HA de virus de la gripe, un vector comprendiendo un promotor unido operativamente a un segmento de ADN que codifica NA de virus de la gripe, un vector comprendiendo un promotor unido operativamente a un segmento de ADN que codifica M1 de virus

50

55

60

de la gripe, un vector comprendiendo un promotor unido operativamente a un segmento de ADN que codifica una proteína M2, ej., una proteína M2 mutante, y un vector comprendiendo un promotor unido operativamente a un segmento de ADN que codifica NS1 y/o NS2. En una realización, se proporcionan y emplean vectores separados para mRNA M1 y M2, y/o para mRNA NS1 y NS2.

5 En una realización de un método para preparar un virus de la gripe recombinante biológicamente contenido de la invención, cada cassette de transcripción está en un vector plasmídico. En una realización de un método de preparación de un virus de la gripe biológicamente contenido de la invención, una o más cassettes de transcripción están en uno o más vectores plasmídicos, ej., un vector plasmídico tiene cassettes de transcripción para la producción de vARN de PA, PB1, HA, NP, NA, M1, NS1 y/o NS2, y cADN PB2 mutante. En una realización de un método para preparar el virus de la gripe contenido biológicamente de la invención, un vector plasmídico tiene una de las cassettes de transcripción para la producción de mRNA, y otro vector plasmídico tiene las otras cassettes de transcripción para la producción de mRNA. En una realización de un método para preparar el virus de la gripe biológicamente contenido de la invención, se emplean tres vectores plasmídicos para la producción de mRNA, cada uno con una de las cassettes de transcripción para la producción de mRNA. En una realización de un método para la preparación del virus de la gripe biológicamente contenido de la invención, un vector plasmídico tiene seis de las cassettes de transcripción para la producción de vARN, y otro vector plasmídico tiene la otra cassette de transcripción para la producción de vARN, ej., un vector plasmídico tiene una de las cassettes de transcripción para la producción de mRNA, y otro vector plasmídico tiene las otras cassettes de transcripción para la producción de mRNA. En una realización de un método de preparación de un virus de la gripe contenido biológicamente de la invención, se emplean tres vectores plasmídicos para la producción de mRNA. En una realización de un método para la preparación del virus de la gripe biológicamente contenido de la invención, un plásmido tiene las tres cassettes de transcripción para la producción de mRNA. En una realización de un método de preparación de un virus de la gripe contenido biológicamente de la invención, el cDNA HA codifica un punto de escisión avirulento. En una realización de un método de preparación de un virus de la gripe biológicamente contenido de la invención, HA y NA son del mismo aislado de virus. En una realización de un método de preparación de un virus de la gripe biológicamente contenido de la invención, la HA es una HA tipo B.

El promotor o la secuencia de terminación de transcripción en un vARN o vector de expresión de proteína viral puede ser el mismo o distinto respecto al promotor o cualquier otro vector. En una realización, el vector o plásmido que expresa vARN de la gripe comprende un promotor adecuado para la expresión en por lo menos una célula huésped particular, ej., células huésped de ave o mamífero, como células caninas, felinas, equinas, bovinas o de primate, incluyendo células humanas, o para expresión en más de un huésped. En una realización, el promotor Poll para cada vector conteniendo Poll es el mismo. En una realización, el promotor Poll es un promotor Poll humano. En una realización, el promotor Poll para cada vector que contiene Poll es el mismo. En una realización, el promotor Poll para dos o más, pero no todos los vectores que contienen Poll, es el mismo. En una realización, el promotor Poll para cada vector que contiene Poll es diferente.

En otra realización, el método incluye el contacto de una célula huésped con un vector que tiene un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll unido a DNA PA de un virus de la gripe unido a un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción (una cassette bidireccional) Poll, un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, unido a ADN PB1 de un virus de la gripe unido a un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll unido a DNA PB2 de un virus de la gripe mutante, unido a un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, unido a ADN HA de un virus de la gripe unido a un promotor Poll unido a una secuencia de transcripción Poll, un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll unido a DNA NP de un virus de la gripe unido a un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll unido a ADN M de un virus de la gripe unido a un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, y un vector con un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll unido a ADN NS1 y/o NS2 de un virus de la gripe unido a un promotor Poll unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll. La célula huésped comprende ADN PB2 expresando una proteína PB2, ej., de un promotor beta actina de pollo. No está presente ninguna fuente de vARN para PB2 de tipo salvaje por lo que se proporciona un virus incompetente para replicación.

55 En una realización, el promotor para la producción de vARN en una cassette bidireccional incluye pero no está limitado a un promotor de ARN polimerasa I (Poll), ej., un promotor de ARN Poll humano, un promotor de ARN polimerasa II (Poll), un promotor de ARN polimerasa III, un promotor SP6, un promotor T7, o un promotor T3. En una realización, uno o más vectores de vARN incluyen un promotor Poll y secuencias de ribozima 5' a secuencias de virus de la gripe y las mismas o distintas secuencias de ribozima 3' a las secuencias del virus de la gripe. En una realización, el segmento génico PB2 mutante está en un vector y va unido operativamente a un promotor incluyendo, pero sin limitación, un promotor de ARN Poll, ej., un promotor de ARN Poll humano, un promotor de ARN Poll, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor SP6, un promotor T7, o un promotor T3. En una realización, los vectores de vARN incluyen una secuencia de terminación de transcripción incluyendo, pero sin limitación, una

secuencia de terminación de transcripción Poll, una secuencia de terminación de transcripción PolIII, o una secuencia de terminación de transcripción PolIII, o uno o más ribozimas. Dentro del marco de la invención, los ribozimas incluyen, pero sin limitación, ribozimas de tetrahymena, RNasa P, ribozimas de cabeza de martillo, ribozimas de horquilla, ribozima de hepatitis, y también ribozimas sintéticas. En una realización, por lo menos un vector para vARN comprende un promotor de ARN polimerasa II unido a una secuencia de ribozima unido a secuencias codificantes virales unido a otras secuencias de ribozima, opcionalmente unido a una secuencia de terminación de transcripción de ARN polimerasa II. En una realización, por lo menos 2, ej., 3, 4, 5, 6, 7 o 8, vectores para la producción de vARN comprenden un promotor de ARN polimerasa II, una primera secuencia de ribozimas, que es 5' en una secuencia correspondiente a secuencias virales incluyendo secuencias codificantes virales, que es 5' en una segunda secuencia de ribozimas, que es 5' en una secuencia de terminación de transcripción. Cada promotor de ARN polimerasa II en cada vector de vARN puede ser el mismo o distinto del promotor de ARN polimerasa II en cualquier otro vector de vARN. De forma similar, cada secuencia de ribozimas en cada vector vARN puede ser la misma o distinta de las secuencias de ribozimas en cualquier otro vector de vARN. En una realización, las secuencias de ribozimas en un vector individual no son las mismas.

La pluralidad de vectores, composiciones y células huésped de la divulgación puede incluir también otro vector para la producción de vARN o de proteínas que incluye secuencias heterólogas, ej., para un gen terapéutico o profiláctico de interés, ej., un inmunógeno para un antígeno asociado al cáncer, o para un patógeno, como una bacteria, un virus no de la gripe, hongo u otro patógeno. Por ejemplo, el vector o plásmido que comprende el gen o cADN de interés puede sustituir a un vector o plásmido para un gen viral de la gripe, o puede añadirse a vectores o plásmidos para todos los genes virales de la gripe. Así, otra realización de la divulgación comprende una composición o pluralidad de vectores como se describe anteriormente, en la que uno de los vectores es sustituido, o comprende además, secuencias de virus de la gripe 5', incluyendo opcionalmente secuencias codificantes de virus de la gripe 5' o una porción de ellas, unido a una secuencia de ácido nucleico deseada, ej., un cADN deseado, unido a secuencias de virus de la gripe 3' incluyendo opcionalmente secuencias codificantes de virus de la gripe 3' o una porción de ellas. En una realización, la secuencia de ácido nucleico deseado, como un cADN está en una orientación antisentido (antigenómica). La introducción de tal vector en conjunción con los otros vectores descritos más arriba en una célula huésped permisiva para la replicación del virus de la gripe, da como resultado el virus recombinante comprendiendo vARN correspondiente a las secuencias heterólogas del vector.

En una realización, el virus recombinante de la divulgación incluye uno o más genes de virus de la gripe A. En otra realización, el virus recombinante de la divulgación puede incluir uno o más genes de virus de la gripe B, ej., un gen de HA de gripe B. Y aún en otra realización, el virus recombinante de la invención puede incluir uno o más genes de virus de gripe C. El ADN para la producción de vARN de NA puede ser de cualquier NA, ej., cualquiera de N1-N9, una secuencia quimérica de NA o cualquier secuencia de NA no nativa, y el ADN para la producción de vARN de HA puede ser de cualquier HA, ej., H1-H16, una secuencia quimérica de HA o cualquier secuencia de HA no nativa. En una realización, los ADNs para la producción de vARN pueden ser para un virus de la gripe B o C. En una realización, pueden introducirse en los vectores otras mutaciones atenuantes, ej., una mutación en un punto de escisión de HA que tiene como resultado un punto no escindido. Los ADNs para la producción de vARN de NA y HA pueden ser de distintas cepas o aislados respecto a los de (6:1:1 reordenantes) o de la misma cepa o aislado (6:2 reordenantes), la NA puede ser de la misma cepa o aislado que para los genes internos (7:1 reordenante), o uno de los genes internos, NA y HA pueden ser de la misma cepa o aislados (5:3 reordenante).

Los virus que pueden proporcionar los genes internos para reordenantes dentro del marco de la invención incluyen virus que tienen elevados títulos de células Vero, ej., títulos de cómo mínimo aproximadamente 10^5 PFU/ml, ej., como mínimo 10^5 PFU/ml, 10^7 PFU/ml o 10^8 PFU/ml; elevados títulos en huevos embrionados, ej., títulos de cómo mínimo aproximadamente 10^7 EID₅₀ (Egg Infective Dose)/ml, ej., como mínimo 10^8 EID₅₀/ml, 10^9 EID₅₀/ml o 10^{10} EID₅₀/ml; elevados títulos en MDCK, de AX5, células, ej., títulos de por lo menos aproximadamente 10^7 PFU/ml, ej., como mínimo 10^8 PFU/ml, o elevados títulos en dos o más de esas células huésped. En una realización, los ADNs para la producción de vARN de vARN PB1, vARN PB2 mutante, vARN PA, vARN NP, vARN M (para M1 y/o M2 o M1 y/o BM2), y/o vARN NS (para NS1 y/o NS2), pueden tener secuencias de un virus de la gripe que se replica a títulos elevados en células de cultivo de mamífero, como células AX4, células Vero o células PER.C6®, y también opcionalmente huevos embrionados, y/o de un virus de vacuna, ej., uno que no cause enfermedad significativa en humanos.

Por ejemplo, se pueden emplear reordenantes con genes internos de otros aislados PR8 o virus de vacunas en virus reordenantes recombinantes de la invención. En particular, se pueden emplear reordenantes 5:1:2 con segmentos génicos PR8(UW) PB1, PB2, PA, NP, y M ("5") y PR8(Cam) NS ("1"); reordenantes 6:1:1 con PR8(UW) NA, PB1, PB2, PA, NP, y M ("6") y PR8(Cam) NS ("1"); y se pueden emplear reordenantes 7:1 con PR8(UW) PB1, PB2, PA, NP, M, NA, y NS ("7").

En una realización, los ADNs de los genes internos para PB1, PB2, PA, NP, M, y NS codifican proteínas con sustancialmente la misma actividad que un polipéptido correspondiente codificado por una de las SEC. ID N°:1-6 o 10-15. Como se emplea aquí, "sustancialmente la misma actividad" incluye una actividad que es aproximadamente el 0,1%, 1%, 10%, 30%, 50%, 90%, ej., hasta el 100% o más, o un nivel de proteína detectable de aproximadamente el 80%, 90% o más, de la actividad o nivel proteico, respectivamente, del correspondiente polipéptido de longitud completa. En una realización, el ácido nucleico es una secuencia que codifica un polipéptido que es

sustancialmente el mismo que, ej., tiene por lo menos 80%, ej., 90%, 92%, 95%, 97% o 99%, incluyendo cualquier entero entre 80 y 99, de identidad de secuencia de aminoácido contigua, un polipéptido codificado por una de la SEC. ID N°:1-6 o 10-15. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada comprende una secuencia de nucleótido que es sustancialmente la misma que, ej., teniendo por lo menos un 50%, ej., 60%, 70%, 80% o 90%, incluyendo cualquier entero entre 50 y 100, o más de identidad de secuencia de ácido nucleico contigua a una de las SEC. ID N°:1-6 o 33-38 y, en una realización, codifica también un polipéptido con por lo menos un 80%, ej., 90%, 92%, 95%, 97% o 99%, incluyendo cualquier entero entre 80 y 99, de identidad de secuencia de aminoácido contigua a un polipéptido codificado por una de las SEC. ID N°:1-6 o 10-15.

En una realización, el polipéptido del virus de la gripe tiene una o más, por ejemplo, 2, 5, 10, 15, 20 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras, ej., sustituciones conservadoras de hasta el 10% o 20% de los residuos, respecto a un polipéptido codificado por una de las SEC. ID N°:1-6 o 10-15. Las sustituciones conservadoras del aminoácido se refieren a la intercambiabilidad de los residuos con cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales hidroxil-alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos con cadena lateral que contenga azufre es cisteína y metionina. En una realización, los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina; fenilalanina-tirosina; lisina-arginina; alanina-valina; glutámico-aspartico; y asparagina-glutamina. En una realización, el polipéptido del virus de la gripe tiene una o más, por ejemplo, 2, 3 o 4, sustituciones de aminoácidos no conservadoras, respecto a un polipéptido codificado por una de las SEC. ID N°:1-6 o 10-15.

Los métodos de producción de virus descritos aquí, que no requieren infección de virus helper, resultan útiles en los estudios de mutagénesis viral, y en la producción de vacunas (ej., para SIDA, gripe, hepatitis B, hepatitis C, rinovirus, filovirus, malaria, herpes, y fiebre aftosa) y vectores de terapia génica (ej., para cáncer, SIDA, adenosina desaminasa, distrofia muscular, deficiencia de ornitina transcarbamilasa y tumores del sistema nervioso central). Por tanto, se proporciona un virus para su uso en terapia médica (ej., para una vacuna o terapia génica).

Los métodos incluyen la administración a un organismo huésped, ej., un mamífero, de una cantidad efectiva del virus de la gripe de la invención, ej., una preparación de virus vivo o inactivado, opcionalmente en combinación con un adyuvante y/o un portador, ej., en una cantidad efectiva para prevenir o mejorar la infección en un animal, como puede ser un mamífero, por este virus o un virus estrechamente relacionado antigénicamente. En una realización, el virus es administrado intramuscularmente, mientras en otra realización, el virus es administrado intranasalmente. En algunos protocolos de dosificación, todas las dosis pueden ser administradas intramuscular o intranasalmente, mientras en otros se emplea una combinación de administración intramuscular e intranasal. En una realización, se administran de dos a tres dosis. La vacuna puede ser multivalente como resultado de la secuencia de nucleótidos heteróloga introducida en un segmento génico viral en el virus de la gripe de la invención. La vacuna puede contener además otros aislados de virus de la gripe, incluyendo virus de la gripe recombinante, otro(s) patógeno(s), agentes biológicos adicionales o componentes microbianos, ej., para formar una vacuna multivalente. En una realización, la vacunación intranasal, conteniendo, por ejemplo virus de la gripe inactivado y un adyuvante mucosal, puede inducir IgA específica del virus y anticuerpo neutralizante en la nasofaringe, además de IgG sérica.

El virus de la gripe de la invención puede emplearse con otros antivirales, ej., amantadina, rimantadina y/o inhibidores de la neuraminidasa, ej., puede ser administrado separadamente en conjunción con esos antivirales, por ejemplo, administrado antes, durante y/o después.

En una realización, los virus de la gripe de la invención pueden ser vectores de vacuna para el virus de la gripe y por lo menos otro patógeno, como un patógeno bacteriano o viral, o para un patógeno distinto al virus de la gripe, patógenos incluyendo pero sin limitación, lentivirus tales como VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus herpes tales como CMV o HSV, virus de la fiebre aftosa, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la parotiditis, rinovirus humano, virus paragripales, tales como el virus sincitial respiratorio y el virus paragripal tipo 1 humano, coronavirus, virus nipah, hantavirus, virus de la encefalitis japonesa, rotavirus, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, o *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el virus de la gripe biológicamente contenido de la invención puede incluir secuencias para la proteína H del virus del sarampión, proteína E1 de la envoltura viral del virus de la rubeola, proteína HN del virus de la parotiditis, RV cápside proteínica VP1 de rinovirus humano, proteína G de virus sincitial respiratorio, proteína S de coronavirus, proteína G o F de virus nipah, proteína G de hantavirus, proteína E del virus de la encefalitis japonesa, VP6 de rotavirus, proteína E de virus del dengue, proteína E del virus del Nilo Occidental, PspA de *Streptococcus pneumoniae*, HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis*, IRP1-3 de *Bordetellapertussis*, o la proteína de utilización heme, el antígeno protector de superficie D15, proteína de unión heme A, o proteína de membrana exterior P1, P2, P5 o P6 de *Haemophilus influenzae*.

Se proporciona además un método para detectar anticuerpos neutralizantes para una cepa de virus de la gripe seleccionada en una muestra fisiológica de un vertebrado. El método incluye contactar la muestra, un virus recombinante de la invención que exprese A y/o NA de la cepa seleccionada, y células susceptibles de infección por virus de la gripe. Se detecta la presencia o cantidad del reporter o el antígeno en las células, donde la ausencia del

reporter o antígeno o una cantidad reducida del reporter o antígeno en la muestra en relación con una muestra control, es indicativo de un vertebrado que ha sido infectado con la cepa de virus de la gripe.

Breve Descripción de las Figuras

5 Figura 1. Diagrama esquemático de vARNs PB2 mutantes y sus eficiencias en la formación e incorporación de viriones. Las cifras de VLPs y las eficiencias de incorporación de viriones de vARNs PB2 mutantes fueron determinados utilizando las cifras de células expresando WSN HA y GFP como denominador. Todos los mutantes se muestran en la orientación de sentido negativo. Cada mutante contiene el marco de lectura GFP (barra verde); 27 y 34 nucleótidos de las regiones no codificantes 3' y 5', respectivamente (barras grises); y regiones codificantes de varias longitudes (barras negras). Las líneas de puntos representan secuencias borradas de la región codificante PB2. PB2(-) indica la omisión de este vARN (es decir, los VLPs se generaron utilizando solamente siete segmentos vARN).

Figura 2. Ejemplo de secuencias génicas internas de virus de vacuna (SEC. ID N°:1-8 y 10-15).

15 Figura 3. Caracterización de virus PR8/PB2-GFP. A) Diagrama esquemático de vARNs tipo salvaje PB2 y PB2(120)GFP(120). vARN PB2(120)GFP(120) posee la región no codificante 3', 120 nucleótidos de la secuencia codificante de vARN PB2, el gen GFP, y 120 nucleótidos de las regiones 3' codificantes y 5' no codificantes de vARN PB2. La región no codificante y las regiones codificantes de vARN PB2 están representadas por barras grises y rojas, respectivamente. El gen GFP viene representado por la barra verde. B) Expresión génica PB2 en células AX4/PB2 (las células AX4 se derivan de células MDCK). Se extrajo ARN de células AX4 tipo salvaje y AX4/PB2. Se realizó RT-PCR utilizando un cebador oligo(dT) seguido por síntesis de cADN y PCR con cebadores específicos PB2 (panel superior) o beta-actina canina (panel inferior). C) Expresión de proteína PB2 en células AX4/PB2. Las células reaccionaron con un anticuerpo anti-PB2 18/1 (Hatta et al., 2000) (paneles de la izquierda) y Hoechst 33342 (paneles de la derecha). Barra de escala, 50 μ m. D) Cinética de crecimiento de PR8/PB2-GFP monitorizada durante 20 72 horas. Células tipo salvaje AX4 (panel superior) y AX4/PB2 (panel inferior) fueron infectadas con virus tipo salvaje PR8 (rojo) o PR8/PB2-GFP (verde) a una MOI (multiplicidad de infección) de 0,001. Los sobrenadantes recogidos en los puntos de tiempo indicados fueron ensayados respecto a virus infecciosos en ensayos de placa con células AX4/PB2.

25 Figura 4. Acomodación de varios genes HA en virus PB2-KO. Expresión HA en células infectadas con virus PB2-KO. Células AX4/PB2 fueron infectadas con PR8/PB2-GFP, WSN/PB2-GFP, CA04/PB2-GFP, o VN1203/PB2-GFP. A las 16 horas post infección, las células fueron teñidas con anticuerpos monoclonales específicos para WSN, CA04, o proteína VN1203 HA. La expresión de HA y GFP fue examinada utilizando microscopio fluorescente.

30 Figura 5. Acomodación de varios genes reporter en virus PB2-456 KO. A) Actividad de luciferasa en células infectadas con virus PB2-KO. Células AX4 tipo salvaje y AX4/PB2 fueron infectadas con PR8/PB2-Fluc (gráfico superior) y PR8/PB2-Rluc (gráfico inferior) a las MOIs indicadas. A las 8 horas post infección se midieron las actividades Fluc y Rluc en las células utilizando un sistema de ensayo de reporter de luciferasa dual. Los resultados de células infectadas por virus fueron comparados con los procedentes de células no infectadas (indicadas por '0') y se calcularon los valores de P utilizando el test t de Student. Asterisco, $P < 0,05$. RLU, unidad de luz relativa. B) Intensidad de GFP en células infectadas por virus PB2-KO. Células AX4/PB2 fueron infectadas con PR8/PB2-GFP con la MOI indicada. A las 8 horas post infección se midió la intensidad de GFP con el lector de microplacas Infinite M1000. Los resultados de las células infectadas por virus fueron comparados con los procedentes de células no infectadas (indicadas por '0') y se calcularon los valores de P utilizando el test t de Student. Asterisco, $P < 0,05$. RFU, unidad fluorescente relativa.

35 Figura 6. Ensayo de microneutralización basado en virus PB2-KO. Células AX4/PB2 fueron infectadas con 100 PFU de CA04/PB2-Rluc que se mezclaron previamente con sueros de hurón diluidos en pocillos triplicados. Se midió la actividad Rluc en las células utilizando un sistema de ensayo luciferasa Renilla a las 24 horas post infección. Los resultados de las células infectadas por virus fueron comparados con los procedentes de células infectadas con virus de suero no tratados (indicado por 'Suero (-)'). Se calcularon los valores de P utilizando el test t de Student. Asterisco, $P < 0,05$. RLU, unidad de luz relativa.

40 Figura 7. Cambio en peso corporal tras la exposición en ratones. Ratones inmunizados con los agentes indicados una (A), dos (B), o tres veces (C) fueron expuestos a 0,5 (i) o 5 (ii) MLD₅₀ de virus PR8. Los valores se expresan como cambios medios en peso corporal \pm DE ($n = 3$).

45 Figura 8. Respuestas de anticuerpos específicos de virus en ratones inmunizados. Se utilizó virus PR8 purificado como antígeno para analizar los títulos de anticuerpos IgG e IgA en suero, lavados nasales y fluidos BAL (superior, medio e inferior, respectivamente) de ratones mock inmunizados con medio o inmunizados con el virus inactivado con formalina o con el virus PB2-KO. Se obtuvieron sueros (paneles superiores) en diferentes tiempos, es decir, prevacunación (barras A), antes de la segunda vacunación (barras B), antes de la tercera vacunación (barras C), y antes de la exposición (barras D). Se obtuvieron lavados nasales y fluidos BAL (paneles medios e inferiores, respectivamente) 1 día antes de la exposición de ratones a quienes se administraba 1 vacunación (barras 1), 2 vacunaciones (barras 2), o 3 vacunaciones (barras 3). Los valores se expresan como la absorbancia media \pm desviación estándar (DE) ($n = 3$). Se indica significación estadística entre las muestras obtenidas de ratones 50 inmunizados con virus inactivado y virus PB2-KO.

- Figura 9. Títulos virales en los pulmones y cornetes nasales (CN) de ratones inmunizados tras la exposición. Las cifras del eje x indican el número de vacunaciones. Tres ratones BALB/c por grupo fueron infectados intranasalmente con las dosis indicadas de virus PR8 (50 µl por ratón) y sacrificados los días 3 y 6 post infección para la titulación del virus. Las barras indican el título viral en cada órgano de cada ratón. La ausencia de barras indica que los títulos virales estaban por debajo del límite de detección de 5 PFU/ml/órgano.
- Figura 10. Detección de anticuerpos contra GFP en el suero de ratones inmunizados con el virus PB2-KO. Células confluentes 293 que expresan transitoriamente GFP fueron tratadas con suero (dilución 1/20) obtenido de ratones inoculados con medio (A), el virus inactivado con formalina (B), o el virus PB2-KO (C) o fueron tratadas con un anticuerpo anti-GFP comercial (D). El ADN (primera columna) fue teñido con Hoechst 33342. GFP (segunda columna) representa células transfectadas con un plásmido para la expresión de GFP. El anticuerpo GFP (tercera columna) representa la presencia del anticuerpo GFP en las muestras. Estas tres imágenes fueron fusionadas (cuarta columna). Barras de escala, 20 µm.
- Figura 11. Detección de expresión de antígeno heterólogo tras infección de células con virus PB2-KO con secuencias para PspA de neumococos (*S. pneumoniae*). Se utilizaron anticuerpos de antiviral de la gripe y anticuerpos anti-PspA para detectar la expresión de virus de la gripe y proteínas PspA en células con PB2-KO-GFP o PB2-KO-PspA.
- Figura 12. Cinética de crecimiento de PB2-KO-PspA en células que no expresan PB2 y células que expresan PB2 establemente.
- Figura 13. IgG e IgA específicas de antígeno de la gripe en suero, BAL y lavados nasales de ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA o PB2-KO-GFP.
- Figura 14. IgG específica de PspA en suero de ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA.
- Figura 15. IgG e IgA específicas de PspA en BAL y lavados nasales de ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA.
- Figura 16. Supervivencia post exposición de ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA y expuestos a 10 DL₅₀ o 100 DL₅₀ de virus de la gripe.
- Figura 17. Replicación del virus en el tracto respiratorio el día 3 post exposición en ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA y expuestos a 10 DL₅₀ o 100 DL₅₀ de virus de la gripe.
- Figura 18. Número de neumococos en lavados nasales de ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA o PB2-KO-GFP y expuestos a 10² CFU *S. pneumoniae* (EF3030)/ratón.
- Figura 19. Supervivencia post exposición de ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA y expuestos a 2 x 10⁷ CFU neumococos WU2 (una cepa letal)/ratón.

Descripción Detallada

Definiciones

- Como se utiliza aquí, virus "infeccioso, biológicamente contenido" significa que el virus es incapaz de producir progenie en células normales, o incapaz de una replicación significativa in vitro o in vivo, ej., títulos inferiores a aproximadamente 10² a 10³ PFU/ml, en ausencia de virus helper o una proteína viral suministrada establemente en trans.
- Como se utiliza aquí, virus de "replicación deficiente" significa que el virus puede replicarse de forma limitada in vitro o in vivo, ej., títulos de como mínimo aproximadamente 10² a 10³ PFU/ml, en ausencia de virus helper o una proteína viral suministrada en trans.
- Como se utiliza aquí, el término "aislado" se refiere a un preparación in vitro, y/o aislamiento de una molécula de ácido nucleico, ej., vector o plásmido, péptido o polipéptido (proteína), o virus de la invención, de forma que no está asociado a sustancias in vivo, o es purificado sustancialmente a partir de sustancias in vitro. Una preparación de virus aislado se obtiene generalmente por cultivo in vitro y propagación, y o vía paso en huevos, y carece sustancialmente de otros agentes infecciosos.
- Como se utiliza aquí, "sustancialmente purificado" significa que la especie objeto es la especie predominante, ej., en base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en una composición, y de preferencia representa por lo menos aproximadamente el 80% de las especies presentes y opcionalmente el 90% o más, ej. el 95%, 98%, 99% o más, de las especies presentes en la composición.
- Como se utiliza aquí, "sustancialmente carente" significa por debajo del nivel de detección para un agente infeccioso en particular utilizando métodos de detección estándar para ese agente.
- Un virus "recombinante" es uno que ha sido manipulado in vitro, ej., utilizando técnicas de ADN recombinante, para introducir cambios en el genoma viral. Los virus recombinantes pueden ser preparados mediante técnicas recombinantes o no recombinantes.

Como se utiliza aquí, el término “ácido nucleico recombinante” o “secuencia o segmento de ADN recombinante” se refiere a un ácido nucleico, ej., a ADN que ha sido derivado o aislado a partir de una fuente, que puede ser posteriormente alterado químicamente in vitro de forma que su secuencia no se produce naturalmente o corresponde a secuencias que se produzcan naturalmente que no están posicionadas como deberían en el genoma nativo. Un ejemplo de ADN “derivado” de una fuente sería una secuencia de ADN identificada como un fragmento útil, y que es entonces sintetizada químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de tal ADN “aislado” de una fuente sería una secuencia de ADN útil que es escindida o separada de dicha fuente por medios químicos, ej., por el uso de endonucleasas de restricción, de forma que puede ser posteriormente manipulada, ej., ampliada, para su uso en la invención, por la metodología de ingeniería genética.

Como se utiliza aquí, una secuencia de nucleótidos “heteróloga” procede de una fuente distinta a un virus de la gripe parental, ej., un gen reporter o un gen de otro virus u organismo, ej., una bacteria, o procede de una fuente de virus de la gripe, pero está en un contexto que no imita un genoma de virus de la gripe nativo, ej., es un subconjunto de un segmento génico de virus de la gripe de longitud completa y está en un contexto no nativo, ej., fusionado a secuencias codificantes de PB2 truncadas.

Como se utiliza aquí un gen o segmento génico del virus de la gripe “heterólogo” procede de una fuente de virus de la gripe distinta a una mayoría de los otros genes o segmentos génicos virales de la gripe en un virus de la gripe recombinante, ej., reordenante.

Los términos “polipéptido aislado”, “péptido aislado” o “proteína aislada” incluyen un polipéptido, un péptido o una proteína codificados por cADN o ARN recombinante, incluyendo uno de origen sintético, o alguna combinación de los mismos.

El término “proteína recombinante” o “polipéptido recombinante”, como se emplea aquí, se refiere a una molécula proteica expresada de una molécula de ADN recombinante. Por el contrario, el término “proteína nativa” se utiliza aquí para indicar una proteína aislada de una fuente natural (es decir, una no recombinante). Se pueden utilizar técnicas biológicas moleculares para producir una forma recombinante de una proteína con propiedades idénticas en comparación con la forma nativa de la proteína.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Así la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias cualesquiera puede realizarse utilizando un algoritmo matemático.

Se pueden utilizar implementaciones informáticas de esos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias, para determinar la identidad de las secuencias. Con estos programas, las alineaciones pueden realizarse utilizando parámetros por defecto. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través de la National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El algoritmo puede incluir primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (high scoring sequence pairs, HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral (T) valorada positivamente al alinearlo con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina. Esos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para hallar HSPs de más longitud que los contengan. Los aciertos de palabras se amplían entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde puede aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación premio para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación penalidad para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineación acumulativa desciende la cantidad X de su valor máximo alcanzado, la puntuación acumulativa tiende a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa, o se alcanza el extremo de una de las secuencias.

Además de calcular el porcentaje de identidad de la secuencia, el algoritmo BLAST puede también realizar un análisis estadístico de la semejanza entre dos secuencias. Una medida de semejanza proporcionada por el algoritmo BLAST puede ser la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca por azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de test es considerada similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácido nucleico de test con la secuencia de ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, de preferencia menos de aproximadamente 0,01, y mejor aún menos de aproximadamente 0,001.

El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) puede utilizar como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP puede utilizar como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. La alineación puede realizarse también manualmente por inspección.

Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de test. Al utilizar un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de test y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordinadas de subsecuencias si es necesario, y se

designan parámetros de programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de test en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

Virus de la gripe

- 5 El ciclo vital de los virus incluye generalmente la unión a los receptores de la superficie celular, la entrada en la célula y descapsidación del ácido nucleico viral, seguido de la replicación de los genes virales dentro de la célula. Tras la síntesis de nuevas copias de proteínas y genes virales, estos componentes se ensamblan en partículas de virus de progenie, que salen entonces de la célula (revisado por Roizman y Palese, 1996). Diferentes proteínas virales desempeñan un papel en cada uno de estos pasos.
- 10 El virus de la gripe A es un virus envuelto de cadena negativa con ocho segmentos de ARN encapsulado con nucleoproteína (NP) (revisado por Lamb y Krug, 1996). Los ARNs virales de ocho cadenas simples de sentido negativo (vARNs) codifican un total de diez a once proteínas. El ciclo vital del virus de la gripe comienza con la unión de la hemaglutinina (HA) a receptores conteniendo ácido siálico en la superficie de la célula huésped, seguido de endocitosis mediada por receptor. El pH bajo en endosomas tardíos desencadena un cambio conformacional en la
- 15 HA, exponiendo así el terminal N de la subunidad HA2 (el denominado péptido de fusión). El péptido de fusión inicia la fusión de la membrana viral y endosomal, y la proteína matriz (M1), y los complejos RNP son liberados al citoplasma. Los RNPs consisten en la nucleoproteína (NP), que encapsula el VARN, y el complejo de polimerasa viral, que está formado por las proteínas PA, PB1, y PB2. Los RNPs son transportados al núcleo, donde se produce la transcripción y la replicación. El complejo ARN polimerasa cataliza tres reacciones distintas: síntesis de un mRNA
- 20 con una estructura 5' cap y 3' polyA, de un ARN complementario de longitud total (cARN), y de vARN genómico utilizando el cADN como plantilla. Los vARNs, NP y proteínas de polimerasa de nueva síntesis se ensamblan entonces en RNPs, son exportados del núcleo y transportados a la membrana plasmática, donde se produce la gemación de partículas de virus de progenie. La proteína neuraminidasa (NA) desempeña un papel crucial tardío en la infección eliminando el ácido siálico de los sialil oligosacáridos, liberando así viriones de nuevo ensamblaje de la
- 25 superficie celular y evitando la autoagregación de las partículas virales. Aunque el ensamblaje del virus incluye interacciones proteína-proteína y proteína-vARN, la naturaleza de tales interacciones es desconocida en gran medida.

Aunque los virus de la gripe B y C son estructural y funcionalmente similares al virus de la gripe A, hay algunas diferencias. Por ejemplo, el segmento M del virus de la gripe B codifica dos proteínas, M1 y BM2, mediante un esquema de terminación-reinicio de cistrones en tándem, y el segmento NA codifica las proteínas NA y NB de un mRNA bicistrónico. El virus de la gripe C, que tiene 7 segmentos de vARN, se basa en transcripciones empalmadas para producir proteína M1; el producto de un mRNA no empalmado es escindido proteolíticamente para producir la proteína CM2. Además, el virus de la gripe C codifica una HA-esterasa (HEF) más que proteínas HA y NA individuales.

- 30 Abarcando la membrana viral del virus de la gripe A hay tres proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), y M2. Los dominios extracelulares (ectodominios) de HA y NA son muy variables, mientras que el ectodominio de M2 es esencialmente invariable entre los virus de la gripe A. Se cree que la proteína M2, que posee actividad de canal iónico (Pinto et al., 1992), funciona en un estadio precoz del ciclo vital del virus, entre la penetración en la célula huésped y la descapsidación del ARN viral (Martin y Helenius, 1991; revisado por Helenius, 1992; Sugrue et al.,
- 40 1990). Una vez los viriones han pasado la endocitosis, se cree que el canal iónico M2 asociado al virión, un paquete helicoidal homotetramero permite a los protones fluir del endosoma al interior del virión, para interrumpir las interacciones del complejo ácido-lábil proteína M1-proteína ribonucleica (RNP), favoreciendo así la liberación de RNP en el citoplasma (revisado por Helenius, 1992). Además, entre algunas cepas de gripe cuyas HAs están escindidas intracelularmente (ej., A/fowl plagues/Rostock/34), se cree que el canal iónico M2 eleva el pH de la red trans-Golgi, evitando cambios conformacionales en la HA debido a condiciones de pH bajo en este compartimento
- 45 (Hay et al., 1985; Ohuchi et al., 1994; Takeuchi and Lamb, 1994).

Líneas celulares que pueden ser utilizadas en la presente invención

- 50 Cualquier célula, ej., cualquier célula de ave o mamífero, como un ser humano, ej., células 293T o PER.C6®, o caninas, bovinas, equinas, felinas, porcinas, ovinas, de roedor, por ejemplo de visón, ej., células MvLu1 o hámster, ej., células CHO, de primate no humano, ej., células Vero, o células de vertebrado superior no primate, ej., células MDCK, incluyendo células mutantes tales como células AX4, que sustentan la replicación eficiente del virus de la gripe, pueden ser utilizadas para aislar y/o propagar los virus de la gripe. Los virus aislados pueden ser utilizados para preparar un virus reordenante. En una realización, las células huésped para la producción de vacunas son
- 55 líneas continuas celulares de mamífero o ave, o cepas celulares. Se puede realizar una caracterización completa de las células a utilizar, por lo que se pueden incluir tests apropiados para la pureza del producto final. Los datos que pueden utilizarse para la caracterización de una célula incluyen (a) información sobre su origen, derivación e historia de paso; (b) información sobre su crecimiento y características morfológicas; (c) resultados de tests de agentes adventicios; (d) características distintivas, como patrones bioquímicos, inmunológicos y citogénicos que permitan reconocer claramente a las células de otras líneas celulares; y (e) resultados de tests de tumorigenicidad. En una
- 60 realización, el nivel de paso, o duplicación de la población, de la célula huésped utilizada es lo más bajo posible.

En una realización, las células son líneas celulares continuas certificadas o certificables por la OMS. Los requisitos para la certificación de tales líneas celulares incluyen la caracterización respecto a por lo menos una característica de genealogía, crecimiento, marcadores inmunológicos, susceptibilidad viral, tumorigenicidad y condiciones de conservación, así como pruebas en animales, huevos y cultivo celular. Tal caracterización se utiliza para confirmar que las células carecen de agentes adventicios detectables. En algunos países puede requerirse también cariólogía. Además, se puede comprobar la tumorigenicidad en células que están en el mismo nivel de paso que las utilizadas para la producción de vacunas. El virus puede purificarse mediante un proceso que ha demostrado ofrecer resultados consistentes, antes de la producción de la vacuna (ver, ej., Organización Mundial de la Salud, 1982).

Los virus producidos por la célula huésped pueden ser purificados altamente antes de la formulación de la vacuna o terapia génica. En general, los procedimientos de purificación consisten en una amplia eliminación de ADN celular y otros componentes celulares y agentes adventicios. También se pueden utilizar procedimientos que degraden o desnaturalicen ampliamente el ADN.

Vacunas de la gripe

Una divulgación de vacuna puede incluir un virus de la gripe recombinante aislado, y opcionalmente otro u otros virus aislados, incluyendo otros virus de la gripe aislados, una o más proteínas o glicoproteínas inmunogénicas de uno o más virus de la gripe aislados o uno o más patógenos distintos, ej., una proteína inmunogénica procedente de una o más bacterias, virus no de la gripe, levaduras u hongos, o ácido nucleico aislado codificando una o más proteínas virales (ej., vacunas de ADN), incluyendo una o más proteínas inmunogénicas del virus de la gripe aislado de la invención. En una realización, los virus de la gripe pueden ser vectores de vacunas de virus de la gripe u otros patógenos.

Una vacuna de virión completo puede ser concentrada por ultrafiltración y luego purificada por centrifugación zonal o cromatografía. Virus distintos al de la invención, como los incluidos en una vacuna multivalente, pueden ser inactivados antes o después de la purificación utilizando formalina o beta-propiolactona, por ejemplo.

Una vacuna subunitaria comprende glicoproteínas purificadas. Una vacuna así puede ser preparada como sigue: utilizando suspensiones virales fragmentadas por tratamiento con detergente, los antígenos de superficie se purifican, por ejemplo por ultracentrifugación. Las vacunas subunitarias contienen así principalmente proteína HA y también NA. El detergente utilizado puede ser por ejemplo detergente catiónico, como hexadecil trimetil bromuro de amonio (Bachmeyer, 1975), un detergente aniónico, como desoxicolato de amonio (Laver & Webster, 1976); o detergente aniónico como el que se comercializa con el nombre de TRITON X100. La hemaglutinina puede ser también aislada tras tratamiento de los viriones con una proteasa, como la bromelina, y luego purificada. La vacuna subunitaria puede combinarse con un virus atenuado de la invención en una vacuna multivalente.

Una vacuna fraccionada comprende viriones que han sido sometidos a tratamiento con agentes que disuelven los lípidos. Una vacuna fraccionada puede prepararse como sigue: una suspensión acuosa del virus purificado obtenido como se indica anteriormente, inactivado o no, es tratado, bajo agitación, por disolventes de lípidos como el éter etílico o cloroformo, asociados a detergentes. La disolución de los lípidos de la envoltura viral produce la fragmentación de las partículas virales. La fase acuosa se recupera conteniendo la vacuna fraccionada, constituida principalmente por hemaglutinina y neuraminidasa con su envoltura original de lípidos eliminada, y el núcleo o sus productos de degradación. A continuación, son inactivadas las partículas infecciosas residuales si esto no se ha hecho ya. La vacuna fraccionada puede combinarse con un virus atenuado de la invención en una vacuna multivalente.

Vacunas inactivadas. Las vacunas del virus de la gripe inactivadas se obtienen inactivando virus replicados utilizando métodos conocidos, como pero sin limitación, tratamiento con formalina o β -propiolactona. Los tipos de vacuna inactivada que pueden utilizarse en la invención pueden incluir vacunas de virus enteros (whole-virus, WV) o vacunas de subviriones (SV) (fraccionadas). La vacuna WV contiene virus intactos inactivados, mientras que la vacuna SV contiene virus purificados alterados con detergentes que solubilizan la envoltura viral que contiene lípidos, seguido de la inactivación química de los virus residuales.

Además, entre las vacunas que pueden utilizarse se incluyen las que contienen proteínas de superficie HA y NA aisladas, a las que se hace referencia como antígeno de superficie o vacunas subunitarias.

Vacunas de virus vivos atenuados. Pueden usarse vacunas del virus de la gripe vivos atenuados, como las que incluyen un virus recombinante de la invención, para prevenir o tratar la infección por virus de la gripe. Se puede conseguir la atenuación en un simple paso por transferencia de genes atenuados de un virus donante atenuado a un virus replicado o reordenado aislado según los métodos conocidos. Dado que la resistencia al virus de la gripe A está mediada básicamente por el desarrollo de una respuesta inmune a las glicoproteínas HA y/o NA, los genes que codifican estos antígenos de superficie proceden de los virus reordenados o aislados clínicos. Los genes atenuados derivan de un progenitor atenuado. En este enfoque, los genes que confieren atenuación generalmente no codifican las glicoproteínas HA y NA.

Hay disponibles virus (virus de la gripe donantes) que son capaces de atenuar reproduciblemente virus de la gripe, ej., un virus donante adaptado al frío (ca) para la producción de vacuna atenuada. Se pueden generar vacunas de virus reordenantes vivos atenuados apareando el virus donante ca con virus replicado virulento. La progenie

reordenante es seleccionada entonces a 25°C (restrictivo para la replicación de virus virulento), en presencia de un antisuero apropiado, que inhibe la replicación de los virus que tienen los antígenos de superficie del virus donante ca atenuado. Los reordenantes útiles son: (a) infecciosos, (b) atenuados para mamíferos no adultos seronegativos y mamíferos adultos cebados inmunológicamente, (c) estables inmunogénica y (d) genéticamente. La inmunogenicidad de los reordenantes ca es paralela a su nivel de replicación. Así, la adquisición de los seis genes transferibles del virus donante ca por nuevos virus tipo salvaje ha atenuado de forma reproducible estos virus para su uso en la vacunación de mamíferos susceptibles, tanto adultos como no adultos.

Se pueden introducir otras mutaciones atenuantes en genes de virus de la gripe por mutagénesis dirigida al sitio para rescatar virus infecciosos con esos genes mutantes. Se pueden introducir mutaciones atenuantes en regiones no codificantes del genoma, así como también en regiones codificantes. Tales mutaciones atenuantes pueden ser introducidas también en genes distintos de HA o NA, ej., el gen M2. Así, pueden generarse también nuevos virus donantes que tengan mutaciones atenuantes introducidas por mutagénesis dirigida al sitio, y tales virus donantes nuevos pueden ser utilizados en la producción de candidatos de vacunas reordenantes vivas atenuadas, en una forma análoga a la descrita anteriormente para el virus donante ca. De forma similar, otras cepas donantes atenuadas conocidas pueden ser reordenadas con virus de la gripe para obtener vacunas atenuadas adecuadas para su uso en la vacunación de mamíferos.

En una realización, tales virus atenuados conservan los genes del virus que codifican determinantes antigénicos sustancialmente similares a los de los aislados clínicos originales. Esto es porque el objetivo de la vacuna atenuada es proporcionar sustancialmente la misma antigenicidad que el aislado clínico original del virus, careciendo al mismo tiempo de patogenicidad hasta el grado de que la vacuna tenga una probabilidad mínima de producir enfermedad grave en el mamífero vacunado.

Así, los virus en una vacuna multivalente pueden ser atenuados o inactivados, formulados y administrados, según métodos conocidos, como una vacuna para inducir una respuesta inmune en un animal, ej., un mamífero. Son bien conocidos por los expertos los métodos para determinar si tales vacunas inactivadas o atenuadas han conservado una antigenicidad similar a la del aislado clínico o la cepa de alto crecimiento derivada del mismo. Tales métodos conocidos incluyen el uso de antisueros o anticuerpos para eliminar virus que expresan determinantes antigénicos del virus donante; selección química (ej., amantadina o rimantidina); actividad e inhibición HA y NA; y cribado de ácido nucleico (como hibridación por sonda o PCR) para confirmar que los genes donantes que codifican a los determinantes antigénicos (ej., genes de HA o NA) no están presentes en los virus atenuados.

30 **Composiciones farmacéuticas**

Las composiciones farmacéuticas, adecuadas para su inoculación, ej., administración nasal, parenteral u oral, comprenden uno o más aislados del virus de la gripe, ej., uno o más virus de la gripe atenuados o inactivados, una subunidad de los mismos, proteína(s) aislada de los mismos, y/o ácido nucleico aislado codificando una o más proteínas de los mismos, comprendiendo además opcionalmente soluciones acuosas y no acuosas, suspensiones y emulsiones estériles. Las composiciones pueden comprender además agentes o excipientes auxiliares, como se conoce en la técnica. La composición de la invención se presenta generalmente en forma de dosis individuales (dosis unitarias).

Las vacunas convencionales contienen en general aproximadamente de 0,1 a 200 µg, ej., de 30 a 100 µg, de HA de cada una de las cepas que entran en su composición. La vacuna que constituye el principal componente de la composición de la vacuna puede comprender un único virus de la gripe, o una combinación de virus de la gripe, por ejemplo, por lo menos dos o tres virus de la gripe, incluyendo uno o más reordenantes.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y/o emulsiones estériles, que pueden contener agentes o excipientes auxiliares conocidos en la técnica. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como el etil oleato. Se pueden utilizar portadores o vendajes oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel e incrementar la absorción de antígeno. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden comprender generalmente una solución de liposomas conteniendo la forma de dosificación líquida. Las formas adecuadas para la suspensión de liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes y elixires conteniendo diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como agua purificada. Además de los diluyentes inertes, tales composiciones pueden incluir también adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, aromatizantes o perfumantes.

Cuando se utiliza una composición para la administración a un individuo, esta puede contener además sales, tampones, adyuvantes u otras sustancias apropiadas para mejorar la eficacia de la composición. Para las vacunas se pueden utilizar adyuvantes, y sustancias que pueden aumentar una respuesta inmune específica. Normalmente el adyuvante y la composición se mezclan previamente a la presentación al sistema inmune, o se presentan por separado, pero en el mismo punto del organismo que se está inmunizando.

Se puede obtener la heterogenicidad de una vacuna mezclando virus de la gripe replicados de por lo menos dos cepas de virus de la gripe, como 2-20 cepas o cualquier rango o valor comprendidos. Se pueden obtener vacunas con variaciones en una cepa individual de un virus de la gripe, utilizando técnicas conocidas en el sector.

Una composición farmacéutica puede comprender además o adicionalmente por lo menos un compuesto quimioterapéutico, por ejemplo, para terapia génica, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios o potenciadores inmunológicos, y para vacunas, quimioterapéuticos incluyendo, pero sin limitación, gammaglobulina, amantadina, guanidina, hidroxibenzimidazol, interferon- α , interferon- β , interferon- γ , factor alfa de necrosis tumoral, tiosemicarbazonas, metisazona, rifampicina, ribavirina, un análogo de la pirimidina, un análogo de la purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, didesoxinucleósidos, un inhibidor de la proteasa o ganciclovir.

La composición puede contener también cantidades variables pero pequeñas de formaldehído carente de endotoxinas, y conservantes, que hayan demostrado ser seguros y no contribuir a producir efectos no deseados en el organismo al que se administra la composición.

10 **Fines farmacéuticos**

La administración de la composición (o los antisueros que produce) puede ser con fines "profilácticos" o "terapéuticos". Cuando se suministran profilácticamente, las composiciones de la invención que son vacunas se suministran antes de que se manifieste cualquier síntoma o signo clínico de una infección patógena. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar toda infección posterior. Cuando se administran profilácticamente, las composiciones de terapia génica de la invención se suministran antes de que se manifieste cualquier síntoma o signo clínico de una enfermedad. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar uno o más síntomas o signos clínicos asociados a la enfermedad.

Cuando se suministra terapéuticamente, una vacuna viral se administra cuando se detecta un síntoma o signo clínico de infección real. La administración terapéutica del compuesto o compuestos sirve para atenuar una infección real. Cuando se administra terapéuticamente, una composición de terapia génica se administra al detectar un síntoma o signo clínico de la enfermedad. La administración terapéutica del compuesto o compuestos sirve para atenuar un síntoma o signo clínico de esa enfermedad.

Así, una composición de vacuna puede ser administrada antes del inicio de la infección (para prevenir o atenuar una infección esperada) o después de la iniciación de una infección real. De forma similar, en la terapia génica, la composición puede ser administrada antes de que se manifieste un síntoma o signo clínico de un trastorno o enfermedad, o después de que se detecte uno o más síntomas.

Se dice que una composición es "farmacológicamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un mamífero receptor. Se dice que tal agente es administrado en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Una composición de la presente invención es fisiológicamente significativa si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor, ej., incrementa por lo menos una respuesta inmune humoral o celular primaria o secundaria contra por lo menos una cepa de un virus de la gripe infeccioso.

La "protección" provista no tiene que ser absoluta, es decir, la infección por gripe no tiene que prevenirse o erradicarse totalmente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población o grupo de mamíferos de control. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o rapidez de aparición de síntomas o signos clínicos de infección por virus de la gripe.

Administración farmacéutica

Una composición puede proporcionar resistencia a uno o más patógenos, ej., una o más cepas de virus de la gripe, por inmunización pasiva o activa. En la inmunización activa, se administra profilácticamente una composición de vacuna viva atenuada a un huésped (ej., un mamífero), y la respuesta inmune del huésped a la administración protege contra la infección y/o la enfermedad. En la inmunización pasiva, el anticuerpo provocado puede ser recuperado y administrado a un receptor del que se sospecha que tiene una infección causada por, como mínimo, una cepa del virus de la gripe. Una composición de terapia génica puede producir niveles profilácticos o terapéuticos del producto génico deseado por inmunización activa.

En una realización, la vacuna se administra a una hembra de mamífero (durante o antes del embarazo o parto), en condiciones de tiempo y cantidad suficientes para causar la producción de una respuesta inmune que sirva para proteger tanto a la hembra como al feto o recién nacido (vía incorporación pasiva de anticuerpos a través de la placenta o la leche materna).

La presente divulgación incluye métodos para prevenir o atenuar un trastorno o enfermedad, ej., una infección por como mínimo una cepa de patógeno. Como se utiliza aquí, se dice que una vacuna previene o atenúa una enfermedad si su administración produce la atenuación total o parcial (es decir, supresión) de un signo clínico o estado de la enfermedad, o en la inmunidad total o parcial del individuo frente a la enfermedad. Como se utiliza aquí, se dice que una composición de terapia génica previene o atenúa una enfermedad si su administración conduce a la atenuación total o parcial (es decir, supresión) de un signo clínico o estado de la enfermedad, o a la inmunidad total o parcial del individuo frente a la enfermedad.

Una composición con por lo menos un virus de la gripe de la presente invención, incluyendo uno atenuado y uno o varios otros virus aislados, una o más proteínas virales aisladas de ellos, una o más moléculas de ácido nucleico

aisladas codificando a una o más proteínas virales de los mismos, o una combinación de lo anterior, puede ser administrada por cualquier medio por el que se alcancen los fines pretendidos.

5 Por ejemplo, la administración de tal composición puede ser por varias vías parenterales, tales como subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, oral o transdérmica. La administración parenteral puede realizarse por inyección de bolo o por perfusión gradual a lo largo del tiempo.

Un régimen típico para prevenir, suprimir o tratar una patología relacionada con un virus de la gripe, comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de vacuna como se describe aquí, administrada como un tratamiento único, o repetida en forma de dosis de mejora o refuerzo, a lo largo de un periodo de hasta e inclusive entre una semana y aproximadamente 24 meses, o cualquier rango o valor comprendidos.

10 Según la presente invención, una "cantidad efectiva" de una composición es una cantidad suficiente para alcanzar un efecto deseado. Se entiende que la dosis efectiva puede depender de la especie, edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si hay alguno, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los rangos de dosis efectivas que se proporcionan más abajo no pretenden limitar la invención y representan rangos de dosis.

15 La dosis de vacuna de un virus vivo, atenuado o muerto para un animal, como un organismo adulto de mamífero, puede ir aproximadamente de 10^2 - 10^{15} , ej., 10^3 - 10^{12} , placas formadoras de unidades (PFU)/kg, o cualquier rango de valor incluido. La dosis de vacuna inactivada puede ir de aproximadamente 0,1 a 1000, ej., de 10 a 100 μ g, como aproximadamente 15 μ g, de proteína HA. No obstante, la dosis debe ser una cantidad segura y efectiva, como se determina por métodos convencionales, utilizando vacunas existentes como punto de partida.

20 La dosis de HA inmunorreactiva en cada dosis de vacuna de virus replicado puede ser estandarizada para contener una cantidad apropiada, ej., de 30 a 100 μ g o cualquier rango o valor aquí contenido, como aproximadamente 15 μ g, o la cantidad recomendada por agencias gubernamentales u organizaciones profesionales reconocidas. La cantidad de NA puede ser también estandarizada, pero esta glicoproteína puede ser lábil durante la purificación y almacenamiento.

25 La dosis de HA inmunorreactiva en cada dosis de vacuna de virus replicado puede ser estandarizada para que contenga una cantidad adecuada, ej., 1 -50 μ g o cualquier rango o valor contenido aquí, o la cantidad recomendada por el U.S. Public Health Service (PHS), que es usualmente de 15 μ g, por componente para niños mayores de 3 años, y 7,5 μ g por componente para niños menores de 3 años. La cantidad de NA puede ser también estandarizada, pero esta glicoproteína puede ser lábil durante el proceso de purificación y almacenamiento (Kendal et al., 1980; Kerr et al., 1975). Cada dosis de 0,5 ml de vacuna puede contener aproximadamente 1 -50 mil millones de partículas de virus, y de preferencia 10 mil millones de partículas.

30 La invención se describirá con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo I

Secuencias de incorporación PB2

35 La mayoría de los segmentos de ARN defectuosos del virus de la gripe A conservan de 150 a 300 nucleótidos correspondiendo a los extremos 5' y 3' del respectivo segmento génico (Duhaut et al., 1998; Jennings et al., 1983; Noble et al., 1995; y Odagiri et al., 1990), indicando que esos 300 a 600 nucleótidos pueden poseer las características estructurales requeridas para una eficiente envoltura del genoma. Para identificar las regiones en los vARNs PB2, PB1, y PA que son críticos para la incorporación del vARN a viriones y la formación de viriones, se generaron plásmidos en los que el gen de GFP está flanqueado por las regiones y porciones no codificantes de las regiones codificantes derivadas de ambos terminales [PB2 (300)GFP(300), PB1 (300)GFP(300), y PA(120)GFP(120)]. La transfección de tal plásmido en células 293T, junto con plásmidos de expresión para las proteínas PB2, PB1, PA, y NP (componentes mínimos para la transcripción y replicación de vARNs), produjo la expresión de GFP en células, indicando que los vARNs quiméricos eran sintetizados por ARN polimerasa I celular, y transcritos a mRNA por las proteínas virales producidas por los plásmidos de expresión.

45 Para calcular las eficiencias de incorporación de vARN a virión, se debe comparar el número de viriones conteniendo un vARN de test con el número total de VLPs. El número total de VLPs puede ser determinado inoculando células con VLPs y contando luego el número de células que expresan una determinada protección contra el virus de la gripe. Para garantizar que el número de VLPs infecciosas determinado por este método no se viera drásticamente afectado por el producto génico viral seleccionado como marcador, determinamos el número de células con expresión de HA o NP. Como estábamos comprobando las eficiencias de incorporación de vARNs PB2, PB1, y PA, se necesitó virus helper para proporcionar proteínas polimerasa funcionales. Para distinguir entre las proteínas HA y NP expresadas de las VLPs de test (derivadas de virus WSN) y las expresadas por el virus helper PR8, utilizamos antibióticos que reconocen las proteínas WSN HA y NP, pero no sus homólogos de virus PR8.

55 Para establecer un sistema que permitiera la evaluación del número de VLPs generadas, se transfectaron células 293T con un plásmido para la transcripción de un vARN de test (derivado del segmento PB2, PB1, o PA), 7 plásmidos para la producción de los vARNs restantes, y 10 plásmidos de expresión para la expresión de las proteínas virales (es decir, PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, y NS2). Cuarenta y ocho horas después, los

sobrenadantes conteniendo VLP derivadas de células transfectadas fueron mezclados con virus helper PR8 y utilizados para infectar células MDCK. Doce horas después de la infección, se determinó el número de células que expresaban proteína HA o NP. En los tres vARNs, las cifras de células que expresaban HA o NP difería en menos de un factor de 3; por ejemplo, utilizando el vARN de test PB2(300)GFP(300), se detectaron 240 800 células con expresión HA, frente a 353 200 con expresión NP. Por consiguiente, en los posteriores experimentos, el número de células con expresión HA se utilizó como indicador de la eficiencia en la formación de viriones infecciosos. Las eficiencias de incorporación de vARNs de test fueron así calculadas dividiendo el número de células con expresión GFP (como marcador para el vARN de test) por la suma del número de células con expresión de HA (como marcador del número de viriones) más el número de células con expresión GFP.

Las secuencias en la región codificante del vARN PB2 afectan a la formación de virión infeccioso y la incorporación de vARN a virión. Para delinear las secuencias en el vARN PB2 que son críticas para la formación de viriones y/o la incorporación de vARN a virión, se generó una serie de plásmidos para la producción de vARNs PB2 que expresan GFP y contienen porciones de la región codificante PB2 derivada de ambos terminales (Figura 1), además de las regiones no codificantes del vARN PB2 (Figura 1). Las cifras de VLPs y las eficiencias de incorporación de los vARNs de test fueron determinadas como se describe más arriba.

Con PB2(300)GFP(300), que contiene 300 nucleótidos correspondientes a las regiones codificantes 5' y 3' del vARN PB2, se detectaron aproximadamente $2,8 \times 10^6$ VLPs por ml. La eliminación gradual de las secuencias codificantes en el extremo 3' del vARN (al que se hace referencia como la región codificante 3') tuvo unos efectos solo moderados sobre la eficiencia de producción de VLP; PB2(0)GFP(120), que carece de la región codificante entera del extremo 3', dio aproximadamente 1×10^6 VLPs/ml. Pero la supresión de las secuencias codificantes en el extremo 5' del vARN (denominado la región codificante 5') [PB2(120)GFP(0)], redujo la producción de VLP en un 98% de la de PB2(300)GFP(300) y dio un número de VLPs comparable al obtenido en ausencia del PB2vARN [PB2(-)]. Este resultado sugiere que las secuencias en la región codificante 5' del vARN PB2 son críticas para la eficiente generación de viriones infecciosos. Posteriores análisis revelaron que 30 nucleótidos de la región codificante 5' son críticos para este fin [comparar las cifras de VLPs para PB2(120)GFP(0) y PB2(120)GFP(30)].

Respecto a las eficiencias de incorporación de vARN a virión, PB2(300)GFP(300), un 54,7% de las VLPs contenía vARN de test PB2(300)GFP(300), indicando que los 300 nucleótidos terminales en ambos extremos son suficientes para la incorporación a viriones. Para alcanzar las eficiencias de incorporación observadas en segmentos de tipo salvaje, es probable que se requirieran secuencias codificantes PB2 internas. La supresión gradual de nucleótidos en la región codificante 3' del vARN PB2 tuvo solamente unos efectos moderados siempre que se conservaran 30 o más nucleótidos; no obstante, la supresión de esos 30 nucleótidos restantes redujo la eficiencia en la incorporación a viriones a un 29,5% para PB2(0)GFP(120), demostrando que esta región es importante para la incorporación eficiente del vARN PB2 a viriones. Para vARNs PB2 que carecen de una secuencia de envoltura funcional en la región codificante 3', secuencias en la región codificante 5' contribuyen a la incorporación a viriones, como ilustra la incapacidad del vARN de test PB2(0)GFP(0) para ser incorporado.

Las supresiones solo en la región de codificación 5', por el contrario, no tuvieron ningún efecto en las eficiencias de incorporación, como lo demuestra una tasa de incorporación del 75,7% para PB2(120)GFP(0). Así, mientras el uso de este vARN de test produjo un número muy bajo de VLPs infecciosas, el vARN de test fue incorporado eficientemente a esas partículas. Este resultado sugiere que las secuencias en el vARN PB2 están implicadas en dos procesos biológicamente distintos: formación eficiente de viriones infecciosos (una función que radica en la región codificante 5') e incorporación eficiente de vARN a partículas (una función que radica básicamente en la región codificante 3').

La diferencia en eficiencias de envoltura podría reflejar diferencias en niveles de transcripción de los vARNs de test en células 293T. Para excluir esta posibilidad, los niveles de PB2(0)GFP(0) y PB2(120)GFP(120) en células 293T transfectadas con plásmidos fueron examinados utilizando PCR en tiempo real. La cantidad de vARN PB2(0)GFP(0) fue del 52% de la de PB2(120)GFP(120); no obstante, es improbable que esta diferencia explique la reducción del 99% en la generación de VLP, y la aniquilación de incorporación a virión del vARN.

El vARN PB2 es más crítico para la generación eficiente de virión infeccioso que el vARN PB1 o PA. Así, puede existir una jerarquía en la que el vARN PB2 es crítico para la eficiente incorporación a viriones de otros vARNs, mientras que la omisión de otros segmentos es en cierta medida tolerable.

La omisión del vARN PB2 dio como resultado una reducción de aproximadamente 30 veces en la producción de VLP, mientras que la omisión de otros segmentos de vARN produjo unas reducciones de 1,4- a 5,1 veces. Estos resultados proporcionaron nuevas pruebas de la existencia de una jerarquía entre los segmentos de vARN respecto a la importancia de los vARNs individuales para la incorporación de los otros segmentos de vARN.

Ejemplo II

La expresión estable de un gen extraño en un virus de la gripe incompetente para la replicación permite el seguimiento efectivo del virus manipulado. En busca de un virus biológicamente contenido con expresión de gen extraño, con amplias aplicaciones en el campo de la virología, se seleccionó una subunidad de polimerasa viral de la gripe que forma parte la ARN polimerasa dependiente de ARN viral trimérico, que es esencial para la replicación del virus. Las secuencias de codificación parciales de los extremos 3' y 5' del ARN (vARN) viral PB2 confieren su más

crítica función en la generación eficiente de viriones infecciosos respecto a los otros vARNs en la jerarquía vARN (Ejemplo I y Muramoto et al., 2006). Este resultado sugiere que un virus de la gripe PB2-knock out (PB2-KO) que alberga un gen reporter flanqueado por las secuencias codificantes y no codificantes del vARN PB2 se replicaría solamente en células con expresión de PB2, mientras expresan establemente el gen reporter.

- 5 Se estableció una línea celular que expresa establemente la proteína PB2, y se utilizó para caracterizar un virus PB2-KO que posee el gen GFP. También se investigó el potencial para que varios genes de HA y NA derivados de varias cepas de virus, así como otros genes reporter, fueran acomodados por el virus PB2-KO. Además, se empleó el virus PB2-KO como plataforma para cribar anticuerpos neutralizantes contra los virus pandémicos 2009.

Métodos

- 10 Células. Células 293T de riñón embrionario humano (un derivado de la línea 293 en la que se insertó el gen para el antígeno del virus de simio 40 T (DuBridge et al., 1987)) fueron mantenidos en medio Eagle modificado de Dulbecco (Lonza), suplementado con suero de ternero fetal al 10% (Invitrogen). Células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) fueron mantenidas en medio esencial mínimo (MEM; Invitrogen) suplementado con suero de ternero recién nacido al 5% (NCS; Sigma, St. Louis, MO). Células AX4, derivadas de células MDCK y transfectadas con el cADN de 2,6-sialiltransferasa humana (Hatakeyama et al., 2005), fueron mantenidas en 5% NCS/MEM + puomicina (2 µg/ml). Células AX4/PB2 (células AX4 que expresan establemente la proteína PB2 derivada de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8), establecidas por transducción con un vector retroviral, (ver la sección de Resultados) fueron mantenidas en 5% NCS/MEM + puomicina (2 µg/ml) + blastidina (10 µg/ml). Todas las células fueron mantenidas a 37°C en 5% CO₂.

- 20 Genética inversa y propagación del virus. Se realizó genética inversa con plásmidos que contenían los cADNs de los genes virales PR8 entre el promotor de ARN polimerasa 1 humana y el terminador de ARN polimerasa 1 de ratón (denominados plásmidos Poll) y plásmidos de expresión de proteína eucariota (NP, PA, PB1, y PB2) bajo el control del promotor de β-actina de pollo (Niwa et al., 1991), como se describe en Neumann et al. (1999). Brevemente, el virus PR8 de tipo salvaje fue diseñado utilizando las ocho estructuras de tipo salvaje producidas previamente, derivadas de PR8 (Horimoto et al., 2007); mientras que el PB2-KO mutante estaba compuesto por pPollPB2(120)GFP(120) (Figura 3A) (Muramoto et al., 2006) y los restantes siete plásmidos segmentales Poll. El plásmido pPollPB2(120)GFP(120) contiene la región no codificante 3'PB2 derivada de A/WSN/33 (H1N1, WSN), 120 nucleótidos que corresponden a la secuencia codificante PB2 en el extremo 3' del vARN, seguida de la secuencia codificante GFP, 120 nucleótidos que corresponden a la secuencia codificante PB2 en el extremo 5' del vARN, y finalmente la región no codificante PB2 5'(Muramoto et al., 2006). Del mismo modo, se formaron pPollPB2(120)Fluc(120) y pPollPB2(120)Rluc(120) para generar virus PB2-KO con genes de luciferasa de luciérnaga (Fluc) o luciferasa Renilla (Rluc), respectivamente. Se mezclaron ocho plásmidos Poll y plásmidos de expresión proteica con el reactivo de transfección TransIT-293 (Mirus), se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se añadieron a células 106 2 93T cultivadas en Opti-MEM 1 (Invitrogen). A las cuarenta y ocho horas post transfección, se recogió el sobrenadante conteniendo virus PR8 o PB2-KO de tipo salvaje y propagado en huevos de gallina embrionados de 10 días, o células AX4/PB2, respectivamente. Se generó también CA04 de tipo salvaje utilizando genética inversa, como se describe en Yamada et al. (2010), y propagado en células MDCK. Los virus propagados fueron titulados utilizando ensayos de placa en células MDCK para determinar las unidades formadoras de placa (PFU) de virus.

- 40 Tinción por inmunofluorescencia de la proteína PB2. Células confluentes AX4 y AX4/PB2 sembradas en platillos con fondo de cristal de 35 mm (Asahi Techno Glass) fueron fijadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo 4% paraformaldehído (Wako Pure Chemical Industries Ltd) y permeabilizadas con 0,1% Triton X-100. Las células fueron incubadas con un clon de anticuerpo anti-PB2 18/1 (Hatta et al., 2000) e incubadas posteriormente con un anticuerpo secundario anti ratón marcado Alexa Fluor 594 (Invitrogen) en Hoescht 33342 (Invitrogen). Las muestras se observaron con un microscopio láser confocal (LSM510META; Carl Zeiss).

- 50 PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Para detectar mARN PB2 en células AX4/PB2, se extrajo el ARN total utilizando un kit de extracción RNeasy ARN (Qiagen Sciences). Se aislaron ARNs virales de viriones utilizando un mini kit de ARN viral QIAmp (Qiagen Sciences). Se realizó transcripción inversa y síntesis de cADN utilizando cebador oligo(dT) y transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). Muestras RT-menos se prepararon como controles negativos. El cADN sintetizado fue amplificado usando PCR con PCR polimerasa Phusion (Finnzymes) y cebadores específicos de PB2. Las secuencias de cebador son como sigue: cebador directo, ATGGAAAGAATAAAAGAACTACGA (SEQ ID NO:9), y cebador reverso GCCACAATTATTGCTTCGGC (ID SEC.Nº:16).

- 55 Cinética del crecimiento y titulación viral. Para determinar las tasas de crecimiento viral, se infectaron pocillos triplicados de células confluentes AX4 o AX4/PB2 con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,001. Tras 1 hora de adsorción viral, se lavaron las células en MEM conteniendo 0,3% BSA, cubierto con MEM conteniendo tripsina tratada con L-(tosilamida-2-fenil) etil clorometil cetona (TPCK) (0,5 µg/ml). Se recogieron los sobrenadantes cada 12 horas durante tres días y se ensayaron con respecto a los virus infecciosos en ensayos de placa en células AX4/PB2.

Inmunotinción. Para evaluar la estabilidad de la incorporación del gen reporter GFP en el virus PB2-KO, células AX4/PB2 fueron infectadas con varias diluciones de virus PB2-KO (sin diluir a 10^{-10}). El sobrenadante del penúltimo pocillo en el que se observó un efecto citopático (CPE) fue recogido y diluido para posteriores infecciones. Sobrenadantes de cinco ciclos de pasos de virus fueron sometidos a ensayos de placa de virus estándar. Una vez se hubo contado el número de placas formadas, se retiró el agar, y los pocillos conteniendo placas fueron fijados con 100% metanol durante 30 minutos. Los pocillos fueron lavados entonces con PBS e incubados con un anticuerpo anti GFP monoclonal (clon GFP-20; Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizó tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti ratón biotinilado de acuerdo con las instrucciones del kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories). Las placas GFP-positivas fueron visualizadas utilizando tabletas Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidina (Sigma), y el número de placas GFP-positivas fue calculado como porcentaje del número total de placas que se formaron en los pocillos respectivos.

Tinción inmunofluorescente para proteína HA. Se generaron virus PB2-KO codificando GFP con vARNs HA y NA derivados de PR8, WSN, A/California/04/09 (CA04), o A/Vietnam/1203/04 (VN1203) utilizando la genética inversa, como se describe más arriba, y propagados en células AX4/PB2. Los múltiples residuos de aminoácidos básicos en el sitio de escisión VN1203 HA fueron sustituidos por una secuencia de escisión de tipo no virulento. Células confluentes AX4/PB2 fueron infectadas con estos virus a una MOI de 0,2-1. A las 16 horas post infección, las células se fijaron con un 4% de paraformaldehído en PBS y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100. Las células fueron incubadas entonces con anticuerpo HA anti-WSN (WS 3-54), un anticuerpo HA anti-CA04 (IT-096; eENZYME), y un anticuerpo HA anti-H5 (VN04-10; Rockland Immunochemicals Inc.) y luego incubadas nuevamente con un anticuerpo secundario anti ratón marcado Alexa Fluor 594. Las muestras fueron observadas con un microscopio de fluorescencia.

Ensayo de luciferasa. Células infectadas con virus PB2-KO codificando gen Flue o Rluc fueron sujetas a un ensayo de luciferasa utilizando un sistema de ensayo reporter de luciferasa dual (Promega) a las 8 horas post infección, según las instrucciones del fabricante. Las actividades Flue y Rluc fueron medidas con un lector de microplaca Infinite M1000 (Tecan).

Ensayo de microneutralización. Se recogieron sueros de dos hurones infectados con 10^6 PFU de CA04 tipo salvaje tres semanas post infección y de dos hurones no infectados. Diluciones seriales dobles de suero de hurón tratado con enzima destructor de receptor (DENKA SEIKEN CO., LTD) se mezclaron con 100 PFU de CA04 de tipo salvaje o virus PB1-KO codificante de Rluc con vARNs HA y NA derivados de CA04 (CA04/PB2-Rluc). Tras incubación a 37°C durante 1 hora, células AX4 o AX4/PB2 de tipo salvaje fueron inoculadas con las mezclas de suero de virus tipo salvaje o PB2-KO, respectivamente, en pocillos triplicados, e incubadas durante tres días o 24 horas para el virus tipo salvaje o virus PB2-KO, respectivamente. La actividad de neutralización de los sueros de hurón fue determinada en base al CPE observado bajo el microscopio o la actividad Rluc, medido utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Renilla (Promega) para el virus tipo salvaje o los virus PB2-KO, respectivamente.

Resultados

Caracterización de los virus GFP PR8/PB2. Para establecer una línea celular que exprese establemente la proteína PB2, las células AX4, que son células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) con sobreexpresión de 2,6-sialiltransferasa humana, que permiten una mejor replicación de aislados de gripe clínicos comparado con células MDCK de tipo salvaje (Hatakeyama et al., 2005), fueron transducidas con un vector retroviral que tenía el cADN de la proteína A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8) PB2 seguido de una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno derivado del virus de la encefalomiocarditis y el gen de resistencia a blasticidina. Un clon de célula resistente a blasticidina fue designado como AX4/PB2. Para confirmar la expresión de mRNA para la proteína PB2 en células AX4/PB2, se extrajeron ARNs totales de células AX4/PB2 y células AX4 de tipo salvaje y fueron sometidos a RT-PCR con cebadores específicos PB2. mRNA PB2 fue detectado en células AX4/PB2 pero no en células AX4 de tipo salvaje (Figura 3B). Para seguir validando la expresión de la proteína PB2 en células AX4/PB2, se realizó tinción por inmunofluorescencia de células AX4/PB2 utilizando un anticuerpo monoclonal específico PB2. Se detectaron señales fluorescentes en células AX4/PB2 y en algunas de las células AX4 transfectadas con plásmidos con expresión de proteína PB2 (que sirvieron como control positivo), mientras que no se detectó señal en células AX4 de tipo salvaje (Figura 3C). Estos resultados indican que las células AX4/PB2 expresan establemente la proteína PB2.

Para investigar si las células con expresión PB2 son compatibles con la replicación del virus PB2-KO, se generó un virus PB2-KO con base PR8 conteniendo vARN PB2(120)GFP(120) (Figura 3A), designado como PR8/PB2-GFP (Tabla 1), y se utilizó para infectar células AX4/PB2 y células AX4 de tipo salvaje (Figura 3D). Aunque se detectó virus no infeccioso en células AX4 tipo salvaje, la replicación del virus PR8/PB2-GFP en células AX4/PB2 fue comparable a la de PR8 de tipo salvaje (Figura 3D). Estos resultados indican que la replicación del virus PB2-KO queda restringida a células con expresión PB2.

Tabla 1

Virus	Origen de:			
	Gen HA	Gen NA	Gen PB2	Genes restantes
PR8 tipo salvaje	PR8	PR8	PR8	
PR8/PB2-GFP	PR8	PR8	PB2(120)GFP(120) ^{II}	
PR8ΔPB2	PR8	PR8		
WSN/PB2-GFP	WSN [†]	WSN	PB2(120)GFP(120)	
CA04/PB2-GFP	CA04 [‡]	CA04	PB2(120)GFP(120)	PR8
VN1203/PB2-GFP	VN1203 [§]	VN1203	PB2(120)GFP(120)	
PR8/PB2-Rluc	PR8	PR8	PB2(120)Rluc(120) ^{II}	
PR8/PB2-Fluc	PR8	PR8	PB2(120)Fluc(120) ^{II}	
CA04/PB2-Rluc	CA04	CA04	PB2(120)Rluc(120)	

PR8, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

†WSN, A/WSN/33 (H1N1).

‡CA04, A/California/04/09 (H1N1).

§VN1203, A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Los múltiples residuos de aminoácidos básicos en el sitio de escisión HA (RERRRKKR↓G) fueron sustituidos por una secuencia de escisión de tipo no virulento (RETR↓G).

^IPB2(120)GFP(120), PB2(120)Rluc(120), y PB2(120)Fluc(120). Genes GFP, de luciferasa de luciérnaga y de luciferasa Renilla, respectivamente, flanqueados por las secuencias no codificantes 3' y 5' y 120 bases de las secuencias codificantes 3' y 5' del gen PB2., no aplicable.

La estabilidad del gen reporter en virus PB2-KO fue comprobada mediante el paso serial del virus PR8/PB2-GFP en células AX4/PB2. Se calcularon las placas con expresión GFP frente a las placas totales formadas para determinar el porcentaje de virus formadores de placa expresando el gen reporter GFP (Tabla 2); tras cinco pasos en serie, un 80%-90% de los virus formadores de placa expresaron GFP. El virus PB2-KO no formó placas en células tipo salvaje incluso después de cinco pasos seriales en células AX4/PB2, indicando que es improbable la reversión del virus PB2-KO a un genotipo competente para replicación por recombinación entre el vARN PB2-GFP y ARN PB2 expresado en la célula. Se realizó un intento de rescatar un virus deficiente génico PB2 con siete segmentos vARN (PR8APB2, Tabla 1); no obstante, no se observó efecto citopático (CPE) ni expresión de proteína NP en células AX4/PB2 o AX4 de tipo salvaje, inoculadas con el sobrenadante transfectante para PR8APB2 (datos que no se muestran). Estos resultados subrayan la importancia del vARN PB2 para la generación eficiente de viriones infecciosos (Muramoto et al., 2006).

Tabla 2. Estabilidad génica del virus PB2-KO.

	Proporción de placas GFP positivas del virus en:				
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Exp. 1	100%	90%	90%	100%	80%
Exp. 2	100%	100%	90%	100%	90%
Exp. 3	100%	90%	90%	100%	90%

*Los respectivos sobrenadantes virales fueron sometidos a ensayos de placa de virus estándar en células confluentes AX4/PB2. Se marcaron diez placas por pocillo, que fueron entonces sometidas al ensayo de inmunodetección utilizando un anticuerpo anti GFP para detectar placas virales con expresión GFP. Se presenta el porcentaje de placas que se tiñeron de color marrón. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes (Exp.).

Expresión funcional de distintos genes HA y NA en virus PB2-KO. Dos glicoproteínas de superficie en viriones de gripe A, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), son los principales antígenos protectores (Wright et al., 2007). En particular, la HA media la unión celular; por consiguiente, un anticuerpo contra HA es crucial para la neutralización viral. Se comprobó si las glicoproteínas relevantes de un virus PB2-KO basado en virus PR8 podían ser sustituidas por las de otras cepas virales. A este efecto, se generaron virus PB2-KO codificante de GFP sustituyendo vARNs PR8 HA y NA con los derivados de una cepa H1N1 A/WSN/33 (WSN/PB2-GFP) de laboratorio, una cepa pandémica 2009 (H1N1) A/California/04/2009 (CA04/PB2-GFP), o una cepa altamente patógena H5N1 A/Vietnam/1203/2004

(VN1203/PB2-GFP) (Tabla 1). Se infectaron células AX4/PB2 con esos virus y se sometieron a un ensayo de inmunofluorescencia con varios anticuerpos monoclonales anti HA. En las células infectadas con virus GFP positivas, se detectó la expresión HA específica de cepa viral (Figura 4). Se confirmó por secuenciación que los vARNs NA correspondientes eran incorporados a viriones (datos no mostrados). Estos resultados indican que los genes HA y NA de otros virus de la gripe pueden ser también acomodados en el virus PB2-KO y por consiguiente ser expresados en células infectadas por virus.

Expresión de genes reporter alternativos en virus PB2-KO. La actividad del gen reporter de luciferasa es fácilmente cuantificable y, por consiguiente, su incorporación a virus PB2-KO debería permitir medir la replicación viral en base a la actividad de luciferasa. Para comprobar esta posibilidad, se generaron virus PB2-KO que tenían el gen de luciferasa de luciérnaga (PR8/PB2-Fluc) o Renilla (PR8/PB2-Rluc) en el vARN PB2 (Tabla 1). Células AX4/PB2 y AX4 de tipo salvaje fueron infectadas con esos virus con diversas multiplicidades de infección (MOIs) y sometidas a un ensayo de luciferasa a las 8 horas post infección. En células AX4/PB2 infectadas por virus, se detectaron las actividades Fluc y Rluc de forma dependiente a la dosis; virus infectados a una MOI de 0,1 y 0,001 fueron adecuados para detectar actividades Fluc y Rluc significativas, respectivamente (Figura 5A). Por el contrario, para detectar una intensidad GFP significativa en células infectadas por virus, tuvimos que infectar PR8/PB2-GFP a una MOI de 1 o superior (Figura 5B). Estos resultados indican que los genes Fluc y Rluc pueden ser acomodados en virus PB2-KO, y representan un indicador más cuantitativo para la replicación viral que el gen GFP. Células AX4 de tipo salvaje infectadas con PR8/PB2-Fluc y PR8/PB2-Rluc mostraron también actividades Fluc y Rluc detectables, respectivamente, a una MOI de más de 1 para PR8/PB2-Fluc o 0,01 para PR8/PB2-Rluc, aunque la actividad de ambos genes reporter fue más de 10 veces inferior que la detectada en células AX4/PB2 (Figura 5A). Dado que la proteína PB2 no era suministrada en trans a las células AX4 de tipo salvaje, la expresión de estos genes reporter sugiere que ribonucleoproteínas virales (es decir, PB2, PB1, PA, y NP) derivados de virus entrantes median la transcripción del vARN PB2 de virus PB2-KO a un nivel significativamente alto en células AX4 de tipo salvaje.

Microneutralización basada en virus PB2-KO. Los virus de la gripe con expresión de gen reporter, biológicamente contenidos, tienen el potencial para sustituir a los sistemas de evaluación de replicación viral convencionales, en parte debido a la capacidad para cuantificar el crecimiento vía ensayos de lector de placa. La actividad de neutralización de antisueros se determina típicamente utilizando ensayos de microneutralización convencionales (Itoh et al., 2009; Kobasa et al., 2004), que permiten la detección de anticuerpos neutralizantes basados en la presencia o ausencia de CPE inducido por infección viral o de antígenos virales, tal como se detecta utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. Para utilizar virus PB2-KO para detectar anticuerpos neutralizantes contra virus pandémicos 2009, se generó un virus PB2-KO con vARN PB2 codificando el gen Rluc y vARNs HA y NA derivados de A/California/04/2009 (CA04/PB2-Rluc). CA04/PB2-Rluc (100 PFU) se mezcló con anticuerpos diluidos serialmente recogidos de hurones infectados con CA04 e incubados a 37°C durante 1 hora. Los sueros de hurones no infectados sirvieron como control negativo. Las mezclas de virus-sueros se utilizaron para inocular células AX4/PB2. A las 24 horas post infección se midió la actividad Rluc en células utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Renilla (Promega). Para comparar la sensibilidad de detección, los mismos antisueros fueron también comprobados en cuanto a la actividad de neutralización utilizando un ensayo de microneutralización convencional basado en CPE con células CA04 tipo salvaje y células AX4 tipo salvaje. En el ensayo basado en virus PB2-KO, sueros de hurón diluidos 1:1280 y 1:640 provocaron una reducción significativa en la actividad Rluc en células infectadas por virus (Figura 6). Por el contrario, los títulos neutralizantes de los mismos sueros de hurón, determinados en el ensayo de microneutralización convencional, fueron 160 y 80 (datos que no se muestran). Los resultados indican que el virus PB2-KO acoplado con células con expresión PB2 ofrece un método de detección de anticuerpos neutralizantes que es más sensible que el ensayo de microneutralización convencional.

Debate

Aquí se demuestra que los virus de la gripe PB2-KO son incompetentes para replicación en células de tipo salvaje, pero pasan por múltiples ciclos de replicación en células con expresión de proteína PB2 (Figura 3D). Además, genes reporter flanqueados por las señales de envoltura de vARN PB2 se mantuvieron establemente en virus de progenie (Tabla 1) y se expresaron en células infectadas por virus (Figuras 4 y 5). También se confirmó que genes de HA y NA derivados de distintas cepas de virus fueron acomodados por virus PB2-KO (Figura 4). Estos resultados indican que los virus PB2-KO tienen un amplio potencial de uso en el campo de la virología de la gripe.

Como aplicación práctica, se desarrolló un ensayo de microneutralización basado en virus PB2-KO, y se utilizó para detectar anticuerpos neutralizantes contra el virus pandémico 2009 (Figura 6). Este ensayo basado en virus PB2-KO demostró ser más sensible que el ensayo de microneutralización convencional en términos de detección de anticuerpos neutralizantes. El empleo de virus PB2-KO incompetentes para replicación como plataforma de cribado (Figuras 3C y 3D) puede permitir la detección de anticuerpos neutralizantes contra virus altamente patógenos, tales como las cepas H5N1 y 1918, que normalmente deben ser manipuladas en instalaciones BSL3 y bajo contención de bioseguridad de nivel 2, si bien se requerirá un nivel adicional de bioseguridad (ej., modificación de la secuencia de aminoácido del sitio de escisión HA). Kong et al. (2006) desarrollaron previamente un sistema de cribado de anticuerpos neutralizantes basado en lentivirus pseudotipados HA de la gripe, que también permite la detección de anticuerpos neutralizantes contra agentes de bioseguridad nivel 3. No obstante, estos lentivirus no expresan neuraminidasa viral de gripe, que junto con HA, tiene potencial para inducir anticuerpos neutralizantes (Nayak et al., 2010); por consiguiente, el ensayo basado en virus PB2-KO debe reflejar con más precisión los títulos de

anticuerpos neutralizantes. Aunque las células que expresan establemente vARN de gripe codificando el gen reporter han demostrado también permitir la detección sensible de anticuerpos neutralizantes (Hossain et al., 2010; Li et al., 2009), se requieren virus infecciosos para estos ensayos basados en células recombinantes.

Otra potencial aplicación del virus PB2-KO es su uso como nueva vacuna de la gripe, que creemos es factible por las siguientes razones. Primero, los virus PB2-KO generan elevados títulos ($>10^8$ PFU/ml) en la línea celular AX4/PB2 (Figura 3D); segundo, el hecho de que puedan expresarse proteínas HA y NA (Figura 4) demuestra que el virus PB2-KO puede adaptarse para codificar antígenos deseados; tercero, la transcripción de vARN que se produce en células infectadas con virus PB2-KO (Figura 5A) puede estimular inmunidad innata celular, produciendo ARN de cadena doble; y cuarto, el mantenimiento estable de un gen extraño insertado en el vARN PB2 (Tabla 2) puede servir como portador de un antígeno adicional, permitiendo la ingeniería de PB2-KO como una vacuna multivalente segura.

Hasta la fecha, varios virus recombinantes de la gripe que carecen de una proteína viral particular han demostrado que se replican de forma comparable a los virus de tipo salvaje en cultivo celular, cuando la proteína faltante se suministra in trans. Virus de la gripe carentes de M2 se replican de forma eficiente en células con expresión de M2, y han demostrado potencial como vacuna viva atenuada (Watanabe et al., 2009). Una clara ventaja del virus PB2-KO sobre su homólogo M2 es que el primero es incompetente para replicación en células normales, y por tanto más seguro. Además, no se sabe aún si un gen extraño codificado en la región codificante de proteína M2 puede ser incorporado en virus de progenie y expresado en células infectadas por virus.

Martinez-Sobrido et al. (2010) desarrollaron un ensayo de cribado mejorado para la rápida detección de anticuerpos neutralizantes, utilizando virus de la gripe con el gen de GFP flanqueado por las señales de envoltura de vARN HA. Aunque este virus HA-KO pasó por múltiples ciclos de replicación solamente en células que expresaban la proteína HA, la estabilidad de los genes reporter en este virus HA-KO no fue comprobada en el estudio. De hecho, un virus vARN HA deficiente con siete segmentos vARN pasó por múltiples rondas de replicación en células MDCK con expresión HA (datos que no se muestran), en contraste con el virus PR8 Δ PB2 deficiente vARN PB2 (ver más arriba), sugiriendo que el vARN HA codificante de gen reporter en virus HA-KO puede eliminarse fácilmente durante la replicación en células con expresión HA. Se ha utilizado también un virus competente para replicación que posee el gen de GFP en su vARN NA para detectar anticuerpos neutralizantes (Rimmelzwaan et al., 2011). Una sialidasa bacteriana in trans mejoró la replicación limitada de este virus NA-KO y permitió la recuperación de un título viral razonable; no obstante, la estabilidad del gen reporter del virus NA-KO sigue siendo incierta.

Más recientemente, se han generado virus de la gripe competentes para replicación con el gen de GFP utilizando genes de NS (Manicassamy et al., 2010) o NA (Li et al., 2010) recombinantes. Aunque estos virus tienen potencial como instrumentos de investigación, su replicabilidad provoca problemas de bioseguridad, que no preocupan con el virus PB2-KO. En general, el hecho de que el virus PB2-KO producido en este estudio exprese de forma estable un gen extraño y sea incompetente para la replicación lo hace ideal en términos de fiabilidad y bioseguridad.

En conclusión, se generó un virus de la gripe expresando un gen extraño, biológicamente contenido, sustituyendo el gen PB2 viral por genes reporter. La replicación del virus fue limitada a células que expresaran la proteína PB2 in trans. El gen reporter fue heredado establemente por los virus de progenie durante la replicación en células con expresión PB2. Varios genes HA, NA y reporter fueron acomodados en el virus PB2-KO. Por consiguiente, este virus resulta prometedor en términos de sus numerosas aplicaciones en investigación básica y aplicada del virus de la gripe.

Ejemplo III

La proteína PB2 del virus de la gripe es un componente esencial de la subunidad trimérica de ARN polimerasa dependiente del ARN viral. La PB2 está implicada en la regulación de vías inmunes antivirales del huésped y por tanto de la virulencia, y tiene un importante papel en la incorporación de otros segmentos individuales de vARN (Muramoto et al., 2006). El ejemplo II describía un virus de la gripe PB2-knock-out (PB2-KO) que alberga genes reporter, tales como la proteína fluorescente verde (GFP) en la región codificante de su ARN viral PB2 (vARN). La replicación del virus PB2-KO fue restringida a solo una línea celular expresando establemente la proteína PB2, arrojando un elevado título de $> 10^8$ PFU/ml. Además, durante la replicación vARN PB2 codificando el gen reporter fue incorporado establemente a viriones de progenie, y retenido mediante pasos secuenciales. También el vARN HA y NA del virus de la gripe pudo ser acomodado en el virus de PB2-KO, y expresarse en células infectadas por virus. Por consiguiente, el virus PB2-KO puede ser adaptado para codificar combinaciones deseadas de HA y NA que son los principales antígenos de la gripe, sugiriendo que el virus PB2-KO puede ser utilizado como una plataforma de vacuna multivalente. Aquí comprobamos el potencial de la vacuna del virus PB2-KO inmunizando a ratones, y examinando la respuesta de anticuerpos y la eficacia protectora en ratones.

Materiales y métodos

Células. Células de riñón embrionario humano 293 y 293T (un derivado de la línea 293 en la que se insertó el antígeno 40 T del gen de virus de simio (DuBridge et al., 1987) fueron mantenidas en medio Eagle modificado de Dulbecco (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (Invitrogen, Carlsbad, CA). Células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) fueron mantenidas en medio esencial mínimo (MEM) (Invitrogen) suplementadas con 5% de suero de ternero recién nacido (NCS) (Sigma, St. Louis, MO). Células AX4, que son una

línea celular derivada de MDCK con expresión aumentada de receptores tipo humano para el virus de la gripe, y que fueron producidas por transfección estable de un plásmido expresando la α -2,6-sialiltransferasa humana (Hatakeyama et al., 2005), fueron mantenidas con un 5% de NCS-MEM, suplementado con puromicina (2 μ g/mL). Células AX4/PB2 (células AX4 expresando activamente la proteína PB2 derivada de A/Puerto Rico/8/34 [H1N1, PR8], estabilizadas por transducción con un vector retroviral (Ozawa et al., 2011) fueron mantenidas en 5% de NCS-MEM, suplementado con puromicina (2 μ g/ml) y blasticidin (10 μ g/ml). Todas las células fueron mantenidas en una incubadora humidificada a 37°C en 5% de CO₂.

Genética inversa impulsada por plásmido. Los virus PR8 tipo salvaje y PB2-KO utilizados en este estudio fueron diseñados utilizando la genética inversa, como se describe previamente (Neumann et al., 1999). Para la expresión de ARN viral (vARN), los plásmidos contenían los cADNs clonados de genes PR8 entre el promotor de ARN polimerasa I humana y el terminador de ARN polimerasa I de ratón (denominados plásmidos Poll). Un plásmido [pPollPB2(120)GFP(120)] fue construido para sustituir al plásmido Poll que codifica el segmento PB2 y que contiene la región no codificante 3' PB2 derivada de A/WSN/33(H1N1), 120 nucleótidos que corresponden a la secuencia codificante PN2 en el extremo 3' del vARN, seguido por la secuencia codificante de GFP, 120 nucleótidos que corresponden a la secuencia codificante de PB2 en el extremo 5' del vARN, y finalmente la región no codificante PB2 5' (Muramoto et al., 2006). Para generar el virus PB2-KO, pPollPB2(120)GFP(120) y los restantes 7 plásmidos Poll fueron cotransfectados en células 293T junto con plásmidos de expresión de proteína eucariota para PB2, PB1, PA, y NP derivadas de A/WSN/33, utilizando el reactivo de transfección TransIT 293 (Mirus, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante. A las 48 horas post transfección se recogieron los sobrenadantes conteniendo los virus PR8 o PB2-KO y se inocularon en huevos de gallina embrionados de 10 días o células AX4/PB2, respectivamente. Ambos virus fueron titulados utilizando un ensayo de placa con células AX4/PB2.

Preparación de virus inactivados con formalina. Virus PR8 propagados en huevo fueron concentrados y purificados por ultracentrifugación del fluido alantoideo con un gradiente de densidad de sacarosa del 10% al 50%, y resuspendidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadió formalina (concentración final, 0,1%) para inactivar el virus PR8 purificado a 4°C durante 1 semana. La inactivación del virus fue confirmada pasando los virus dos veces en células MDCK y examinando el efecto citopático o la falta del mismo.

Infección experimental de ratones con virus PB2-KO. Para comprobar la seguridad de los virus PB2-KO en ratones, seis ratones BALB/c hembra de 4 semanas fueron inoculados intranasalmente con 10⁶ PFU/ratón del virus. El peso corporal y la supervivencia de los ratones infectados fueron monitorizados diariamente durante 14 días tras la inoculación. También en los días 1, 3 y 6 post inoculación, se recogieron los pulmones y cornetes nasales de los ratones, se homogenizaron y se sometieron a ensayos de placa para detectar la presencia de virus.

Inmunización y test de protección. Ratones BALB/c hembra de seis o cuatro semanas (3 ratones por grupo) fueron anestesiados con isoflurano e inoculados intranasalmente con 50 μ l de medio (MEM conteniendo 0,3% de fracción V de albúmina de suero bovino), virus PR8 inactivados con formalina (64 unidades de hemaglutinación, que equivale a 10⁶ PFU del virus PB2-KO), o virus PB2-KO (106 PFU) una, dos o tres veces a intervalos de 2 semanas, respectivamente. Tres semanas después de la inoculación final, los ratones fueron expuestos intranasalmente a 0,5 o 5 dosis letales al 50% por ratón (DLM₅₀) de virus PR8. Los días 3 y 6 post infección, se recogieron los pulmones y cornetes nasales de los ratones (3 ratones por grupo), homogenizados en 1 ml de PBS utilizando TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA), y clarificados por centrifugación a baja velocidad (5000 rpm durante 10 minutos a 4°C). Los títulos virales en los homogenados fueron determinados utilizando ensayos de placa con células AX4/PB2. El peso corporal y la supervivencia de los restantes ratones expuestos (3 ratones por grupo) fueron monitorizados diariamente durante 14 días.

Detección de anticuerpos específicos de virus. Se obtuvieron sueros de ratones (3 ratones por grupo) vía sangrado de vena mandibular antes de cada inmunización, y vía arteria femoral 1 día antes de la exposición. Se obtuvieron también muestras de fluidos de enjuagues nasales y lavados broncoalveolares (BAL) (3 ratones por grupo) 1 día antes de la exposición de ratones sacrificados por dislocación cervical. Se practicaron incisiones para insertar una cánula en la tráquea. Los pulmones fueron entonces perfundidos con 1 ml de PBS utilizando una jeringa. El fluido de lavado fue recuperado y conservado en microtubos sobre hielo. El enjuague nasal fue recogido pasando 400 μ l de PBS por la cavidad nasal. Se detectaron anticuerpos IgG e IgA en las muestras de sueros, enjuagues nasales y fluidos BAL utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) como se ha descrito previamente (Kida et al., 1982). Cada pocillo fue recubierto con PR8 purificado alterado con 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) conteniendo 0,5% de Triton X-100 y 0,6 M KCl. Tras la incubación de las placas recubiertas de virus con las muestras del test, se detectaron los anticuerpos IgA e IgG en las muestras utilizando anticuerpos IgA o IgG anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa de rábano (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). Los títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de ratones inmunizados fueron evaluados como se ha descrito previamente (Iwatsuki-Horimoto et al., 2011). Brevemente, el virus (100 dosis de cultivo de tejido infeccioso al 50% [TCID₅₀]) fue incubado con diluciones seriales (dos veces) con sueros tratados con enzima destructor de receptor durante 30 minutos a 33°C, y las mezclas fueron añadidas a células MDCK confluentes en microplacas de 96 pocillos para determinar la actividad neutralizante.

IFA para la detección de anticuerpos contra GFP. 293 células cultivadas en platillos con fondo de cristal de 35 mm (Asahi Techno Glass) fueron transfectadas con un plásmido expresando GFP e incubadas durante 48 horas antes del ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Las células fueron fijadas en PBS conteniendo 4% de paraformaldehído

(Wako Pure Chemical Industries Ltd.) durante 15 minutos, e impermeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% durante 5 minutos. Fueron incubadas durante 1 hora con suero diluido 20 veces obtenido de ratones inmunizados “mock” con medio, o inmunizados con PR8 inactivado con formalina, o con el virus PB2-KO. Las células tratadas con anticuerpo anti GFP (clon GFP-20; Sigma-Aldrich) sirvieron como control positivo. Todas las células fueron entonces incubadas nuevamente durante 1 hora con un anticuerpo secundario anti ratón de cabra marcado Alexa Fluor 594 (Invitrogen) y Hoechst 33342 (Invitrogen) para la detección de anticuerpo de GFP y tinción nuclear, respectivamente. Las muestras fueron observadas con un microscopio láser confocal (LSM510META; Carl Zeiss, Jena, Alemania).

Resultados

Caracterización del virus PB2-KO en ratón. El virus PB2-KO fue incompetente para replicación en células AX4, pero arrojó elevados títulos similares a los de PR8 en células AX4/PB2. Para determinar si el virus PB2-KO puede servir como una vacuna de la gripe, se evaluó su perfil de seguridad en ratones inoculando intranasalmente a cada ratón con el virus PB2-KO (10^6 PFU en 50 μ l) y monitorizando el peso corporal durante 2 semanas. Los ratones alcanzaron de forma constante incrementos de crecimiento estables, y no parecieron afectados por infección por virus PB2-KO (datos que no se muestran). Se obtuvieron muestras de pulmón y cornetes nasales los días 1, 3 y 6 post inoculación, se homogenizaron y fueron sometidas a ensayos de placa en células AX4/PB2 para evaluar el crecimiento del virus PB2-KO en ratones. No se detectaron placas de órganos de ratón infectados con el virus PB2-KO, aunque se observó un elevado título viral (10^8 PFU/g) en el tejido pulmonar del ratón infectado con 10^6 PFU de virus PR8. Estos resultados indican que el virus PB2-KO no creció en ratones y que no se produjo reversión a un virus competente para replicación.

Respuestas de anticuerpo específico de virus en ratones inoculados con el virus PB2-KO. El nivel de respuestas de anticuerpos provocado por el virus PB2-KO fue examinado en ratones que habían sido inoculados intranasalmente con el virus PB2-KO una vez, dos veces o tres veces a intervalos de 2 semanas. A efectos de comparación, se inmunizaron “mock” también ratones con medio, o con virus PR8 inactivado con formalina, con una dosis equivalente a 10^6 PFU del virus PB2-KO. Se recogieron virus en diversos tiempos para determinar la presencia de distintos niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo. También, a las 3 semanas tras la inoculación final se examinaron los niveles de anticuerpos de IgG e IgA contra PR8 en las muestras de sueros, lavados nasales y fluidos BAL utilizando un ELISA (Figura 8). En ninguna muestra se apreció respuesta de IgG ni de IgA en ratones inoculados con medio. Por el contrario, los ratones inmunizados con el virus PR8 inactivado con formalina y el PB2-KO presentaron un incremento dependiente del tiempo en los niveles séricos de IgG e IgA. Tras tres inmunizaciones, se detectaron niveles de anticuerpos similares en ratones inmunizados con virus inactivados y virus PB2-KO. Resultó interesante que, cuando los ratones eran inmunizados una o dos veces, se observaban títulos séricos de IgG o IgA significativamente superiores, respectivamente, en ratones inmunizados con virus PB2-KO que en ratones inmunizados con el virus inactivado con formalina (Figura 8, panel superior). En los lavados nasales de ratones inoculados con virus PB2-KO dos veces y en fluidos BAL de ratones inoculados una y dos veces, los niveles de IgG e IgA fueron significativamente superiores que los de ratones inoculados con el virus inactivado con formalina (Figura 8, paneles medio e inferior, respectivamente). Por tanto, el virus PB2-KO indujo eficientemente respuestas de anticuerpo de IgG e IgA en este modelo murino. Sueros obtenidos de ratones inmunizados “mock” con medio no presentaron anticuerpos neutralizantes, mientras que los de ratones tratados con PB2-KO tuvieron títulos de anticuerpo neutralizante de 1:16, que fue aproximadamente dos veces superior que los de ratones tratados con virus inactivados (datos que no se muestran). No se detectaron actividades neutralizantes en ninguna muestra de enjuague nasal o fluido BAL (datos que no se muestran).

Eficacia de la vacuna del virus PB2-KO. Para evaluar la eficacia como vacuna del virus PB2-KO, se expuso a ratones a 0,5 o 5 DLM₅₀ de virus PR8. La anterior dosis de exposición fue comprobada para simular infecciones naturales, en las que los individuos son habitualmente infectados con una dosis de virus relativamente baja (sin duda una dosis no letal).

(i) Cambios en peso corporal y supervivencia de los ratones inmunizados tras la exposición. Para evaluar la eficacia de vacuna del virus PB2-KO, se examinaron los cambios en el peso corporal y la supervivencia de ratones inmunizados con el virus PB2-KO tras ser expuestos al virus PR8. Los ratones inmunizados “mock” con medio y expuestos a 0,5 DLM₅₀ de PR8 experimentaron una sustancial pérdida de peso corporal, que recuperaron posteriormente (Figura 7, paneles izquierdos). Por otra parte, todos los ratones inmunizados “mock” con medio y expuestos a 5 DLM₅₀ de PR8 registraron una sustancial pérdida de peso corporal y murieron aproximadamente una semana después de la infección (Figura 2, paneles derechos). Los ratones inmunizados una vez con el virus inactivado con formalina o el virus PB2-KO experimentaron pérdida de peso (15%) después de cada dosis de exposición (Figura 7A). Es digno de mención que el 100% de los ratones inmunizados una vez con el virus PB2-KO sobrevivieron, mientras que uno de cada tres ratones inmunizados una vez con el virus inactivado con formalina murieron el día 8 post infección, tras haber sido expuestos a 5 DLM₅₀ del virus PR8 (datos que no se muestran). Todos los ratones inmunizados dos y tres veces con los virus inactivados y PB2-KO sobrevivieron sin pérdida apreciable de peso corporal (Figuras 7B y C).

(ii) Replicación viral en pulmones y cornetes nasales. Para evaluar la replicación viral en los pulmones y cornetes nasales de los ratones inmunizados con el virus PB2-KO, ambos órganos fueron recogidos los días 3 y 6 post exposición con el virus PR8. La Figura 9 muestra la extensión de la replicación viral en esos órganos. El virus PR8 se replicó hasta un título superior en los pulmones y cornetes nasales de todos los ratones inmunizados “mock”.

Aunque la potencia de la vacuna PB2-KO fue similar a la de la vacuna inactivada con formalina en ratones inmunizados una vez, en ratones que recibieron dos o tres vacunaciones la vacuna PB2-KO fue más eficaz que la inactivada con formalina, con títulos virales en ambos órganos considerablemente menores en ratones inmunizados con la primera que en los inmunizados con la última. Tomados en conjunto, estos resultados indican que el virus PB2-KO tiene una mejor potencia como vacuna de la gripe que el virus inactivado con formalina.

Detección de anticuerpos contra GFP en ratones inoculados con el virus PB2-KO. Finalmente, se determinó si el virus PB2-KO podía inducir anticuerpos contra GFP, porque el virus PB2-KO utilizado aquí tiene el gen GFP en su región codificante PB2, y GFP fue expresada en células de cultivo PB2-KO infectadas con virus (datos que no se muestran). La detección de un anticuerpo anti GFP en el suero de ratones inoculados con virus PB2-KO sugeriría el potencial de este sistema como plataforma para el desarrollo de una vacuna multivalente basada en el virus de la gripe. Por tanto, se recogió suero de ratones el día 3 post exposición y se ensayó en un IFA. No se detectó GFP en suero de ratones inmunizados "mock", o en los de inmunizados con la vacuna inactivada (Figura 10); no obstante, en sueros de ratones inmunizados con el virus PB2-KO, así como un anticuerpo anti GFP comercial (que sirvió como control positivo), se detectó expresión de GFP. Estos resultados indican que se indujo un anticuerpo contra GFP en ratones inmunizados con el virus PB2-KO, sugiriendo la potencial aplicación del virus PB2-KO como vacuna multivalente.

Debate

Se demostró aquí que un virus PB2-KO incompetente para replicación provoca respuestas de anticuerpo protector específico de virus, y que este virus induce también anticuerpos contra la proteína reporter codificada en la región de codificación de su segmento PB2. En particular, la vacuna de PB2-KO protegió a los ratones contra una exposición letal con virus H1N1 PR8, sugiriendo el potencial de esta vacuna contra la infección de la gripe A. La capacidad de detectar anticuerpos contra GFP en sueros de ratones inoculados con virus PB2-KO sugirió que si el gen reporter, o en este caso GFP, debía ser sustituido por la región antigénica de otro patógeno, los ratones inoculados con el virus recombinante expresarían anticuerpos contra este patógeno secundario; sugiriendo a su vez su potencial como vacuna multivalente. Por consiguiente, el virus PB2-KO incompetente para replicación puede servir como plataforma para una vacuna contra la gripe, así como para una vacuna multivalente si la región codificante PB2 es sustituida por la porción antigénica de otro patógeno.

Se ha informado de que vacunas inactivadas y vivas atenuadas incluyendo virus con gen knock-out, inmunizan con éxito a ratones contra infecciones de gripe letales. El virus M2-KO que carece de membrana trans y dominios de cola citoplásmicos se replica eficientemente en células con expresión M2, y demuestra potencial como vacuna viva atenuada (Watanabe et al., 2009). El HA-KO demostró también pasar por múltiples ciclos de replicación en células que expresan constitutivamente la proteína HA (Martinez-Sobrido et al., 2010); no obstante, parece que se requieren grandes cantidades de virus produciendo suficiente proteína HA en elevados títulos para conseguir eficacia protectora. La incorporación y mantenimiento estables del gen reporter no han sido estudiados en los sistemas M2-KO o HA-KO. Previamente se demostró que partículas similares a virus (VLPs) incompetentes para replicación, provocan respuestas inmunes mucosales y sistémicas en un modelo murino. VLPs que carecen de NS2 protegen a los ratones contra varias dosis letales de virus de la gripe (Watanabe et al., 2002). No obstante, la ausencia de una línea celular que exprese constitutivamente NS2 impide la producción eficiente de suficientes VLPs para alcanzar eficacia protectora.

En contraste con el M2-KO, HA-KO y/o VLPs descritos más arriba, el virus PB2-KO pudo ser preparado en una línea celular que expresaba PB2, produjo elevados títulos e incorporó y mantuvo establemente un gen de GFP durante la replicación viral (Ozawa et al., 2011). Estos datos establecen claramente la viabilidad de utilizar este sistema para la producción de una vacuna eficiente.

La seguridad es de la máxima importancia en lo que se refiere al potencial uso de virus como vacunas. Actualmente, las vacunas de la gripe vivas atenuadas y la mayoría de las inactivadas son propagadas en huevos de gallina embrionados, aunque se han autorizado en Europa vacunas a base de células. Dado que un requisito previo para la propagación con éxito basada en huevo de una vacuna es la selección de variantes adaptadas a huevos de gallina embrionados en el momento de la implementación, el virus de la vacuna puede ser ligeramente distinto de los virus circulantes en términos de antigenicidad (Fulvini et al., 2011; Hardy et al., 1995; Robertson, 1993). Debido a la propensión de las proteínas del huevo en esas vacunas a provocar alergias, las vacunas inactivadas, administradas parenteralmente, producidas en huevo, van asociadas a reacciones adversas o anafilácticas en algunos individuos (Halperin et al., 2002). Una complicación añadida es el posible agotamiento de existencias de pollos en caso de un brote de pandemia de gripe aviar altamente patógena, que podría poner en peligro la producción en masa de vacunas (Hampson, 2008).

Por el contrario, las alternativas basadas en células presentan varias ventajas sobre la propagación de la vacuna basada en huevo convencional. La capacidad de producción puede aumentar fácilmente en proporción con la demanda. Además, al contrario que en los virus cultivados en huevo, la antigenicidad de los virus cultivados en células coincide con la de los animales y humanos (Katz et al., 1990; Robertson et al., 1991).

Se estableció una línea celular que expresa establemente virus PB2 y PB2-KO replicado eficientemente en esta línea celular (es decir, a un nivel comparable a la del virus tipo salvaje) (Ozawa et al., 2011). En células que no expresan PB2 en trans, el virus PB2-KO incompetente para replicación solo pasa por un único ciclo de replicación, y

no se formarán partículas infecciosas; así, el virus PB2-KO provoca una respuesta de anticuerpo protector sin permitir la replicación de virus infeccioso. Por consiguiente, una vacuna PB2-KO basada en células elimina varios obstáculos en la preparación y suministro de vacunas.

5 Además, la eliminación del gen PB2 hace que el virus de la gripe PR8 sea incompetente para la replicación sin evidencia de recombinación entre el vARN PB2 recombinante y el mARN proteína PB2 incluso con múltiples ciclos de replicación.

10 Una vacuna inactivada con formalina protegió eficientemente a ratones contra la exposición a dosis letales del virus PR8 provocando respuestas inmunes (Figuras 7-9). No obstante, aunque los resultados en términos de supervivencia y pérdida de peso corporal fueron similares en los ratones inmunizados con la vacuna inactivada con formalina, y los inmunizados con la vacuna PB2-KO (Figura 7), los títulos virales en los pulmones y cornetes nasales de los ratones inmunizados con la primera vacuna fueron superiores que los de los ratones inmunizados con la segunda (Figura 9). Estos resultados reflejan probablemente diferencias en los niveles de respuesta inmune (Figura 8). También resulta plausible que fueran activadas respuestas de linfocito T citotóxico (CTL) por el virus PB2-KO, pero no por el virus inactivado con formalina, dado que se considera que antígenos inactivados no inducen respuestas CTL, aunque en este estudio no se examinaron dichas respuestas.

15 Por definición, una vacuna multivalente o polivalente se refiere a una vacuna diseñada para provocar una respuesta inmune a uno o más agentes infecciosos, o a varios determinantes antigénicos distintos de un único agente. Basado en el hecho de que otros genes reporter y los genes HA y NA de distintas cepas de virus pueden ser acomodados por el virus PB2-KO, resulta viable el diseño y producción de una vacuna multivalente. Como resultado, es concebible que la vacuna PB2-KO pueda proporcionar protección contra distintas cepas antigénicas de gripe, o subtipos de gripe y/o otros patógenos. Una ventaja adicional es la posibilidad de administración mucosal de la vacuna, evitando el empleo de agujas para la inyección subcutánea de la vacuna, etc.

20 En conclusión, dado que el virus PB2-KO provocó respuestas inmunes efectivas, indujo anticuerpos contra el producto de un gen reporter codificado en su segmento PB2, se propaga fácilmente y puede ser administrado con seguridad como vacuna, el virus PB2-KO constituye un candidato para vacuna creíble, seguro y eficaz.

Ejemplo IV

30 El *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno respiratorio que causa infección bacteriana secundaria tras la infección por virus de la gripe, que va asociada a elevada mortalidad en ancianos. Virus paragripales, como el virus sincitial respiratorio y el virus paragripal tipo 1 humano, son patógenos respiratorios que causan manifestaciones graves en niños. Actualmente no hay vacunas disponibles para los virus paragripales. El virus PB2-KO pudo ser utilizado como vacuna multivalente porque se indujo un anticuerpo contra el producto de gen reporter (en este caso GFP) codificado en la región codificante del segmento PB2, en lugar de PB2 auténtico (Figura 10). Si importantes antígenos de patógenos son codificados de modo similar en la región codificante del segmento PB2, el virus PB2-KO podría inducir respuestas inmunes contra esos antígenos, así como contra proteínas virales de la gripe, protegiendo por tanto a los niños y los ancianos contra esas graves enfermedades respiratorias.

35 La Figura 11 muestra la expresión del antígeno PspA de *Streptococcus pneumoniae* y virus de la gripe en células con PB2-KO-PspA, y la expresión del antígeno de virus de la gripe en células con PB2-KO-GFP. El PB2-KO-PspA ha mostrado una cinética de crecimiento similar a la del virus de la gripe tipo salvaje en células que expresan PB2 en trans, pero no puede expandirse en células que no expresan PB2 en trans (Figura 12).

40 Los ratones infectados con PB2-KO-PspA o PB2-KO-GFP tienen IgG e IgA específica de la gripe en suero, BAL y lavados nasales (Figura 13), y los ratones infectados con PB2-KO-PspA, pero no con PB2-KO-GFP, tienen IgG específica de neumococo en suero (Figura 14), y en BAL y lavados nasales (Figura 15).

45 Los ratones inmunizados tres veces con PB2-KO-PspA sobrevivieron a la exposición al virus de la gripe (Figura 16) y *Streptococcus pneumoniae* (Figura 19). Pudo detectarse virus de la gripe en los ratones control e inmunizados, en cornetes nasales y pulmón, el día 3 post exposición (Figura 17). Tras la exposición, la carga bacteriana se redujo en los ratones inmunizados PB2-KO-PspA, pero no en PB2-KO-GFP, (Figura 18).

Referencias

- Cox et al., *Scand. J. Immunol.*, 59:1 (2004).
- Davies et al., *Science*, 144:862 (1964).
- 50 DuBridge et al., *Mol. Cell Biol.*, 7:379 (1987).
- Duhaut et al., *Virology*, 248:241 (1998).
- Gruber, *Vaccine*, 20:566 (2002).
- Fiore et al., *MMWR Recommend. Rep.*, 59:1 (2010).
- Fulvini et al., *PLoS One*, 6:e20823 (2011)
- 55 Halperin et al., *Vaccine*. 20:1240 (2002).

- Hampson, *Ann. Acad. Med. Singapore*, 37:510 (2008).
- Hardy et al., *Virology*. 211:302 (1995).
- Hatakeyuma et al., *J. Clin. Microbiol.*. 43:4139 (2005).
- Hatta et al., *Arch. Virol.*. 145:1947 (2000).
- 5 Hayden, *Trans. R. SocLond. B. Biol. Sci.*. 356:1877 (2001).
- Hoffmann et al., *J. Virol.*. 79:11014 (2005).
- Horimoto et al., *Virology*. 366:23 (2007).
- Hossain et al., *J. Clin. Microbiol.*. 48:2515 (2010).
- Itoh et al., *Nature*. 460:1021 (2009).
- 10 Iwatsuki-Horimoto et al., *Clin. Vaccine Immunol.*, 18:860 (2011).
- Jennings et al., *Cell*, 34:619 (1983).
- Katz et al., *J. Virol.*. 64:1808 (1990).
- Kemble et al., *Vaccine*, 21:1789 (2003).
- Kida et al., *Virology*. 122:38 (1982).
- 15 Kobasa et al., *Nature*. 431:703 (2004).
- Kong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103:15987 (2006).
- Li et al., *J. Virol.*. 84:12075 (2010).
- Li et al., *Viruses*. 3:241 (2009).
- Lin et al., *Virus Res.*. 103:47 (2004).
- 20 Maassab, *Nature*. 219:645 (1968).
- Manicassamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107_:11531 (2010).
- Martinez-Sobrido et al., *J. Virol.*. 84:2157 (2010).
- Moss et al., *J. Antimicrob. Chemother.*. 65:1086 (2010).
- Muramoto et al., *J. Virol.*. 80:2318 (2006).
- 25 Murphy et al., *Viral. Immunol.*, 15:295 (2002).
- Nayak et al., *J. Virol.*. 84:2408 (2010).
- Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9345 (1999).
- Niwa et al., *Gene*. 108:193 (1991).
- Noble et al., *Virology*. 210:9 (1995).
- 30 Odagiri et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:5988 (1990).
- Ozawa et al., *J. Gen. Virol.*. 92:2879 (2011).
- Palese et al., *J. Clin. Invest.*. 110:9 (2002).
- Palese et al., In *Fields virology*. 5th edn, pp. 1647-1689 (2007), Edited by D. M. Knipe & P. M. 35 Howley, Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers.
- 35 Reichert et al, *N. Engl. J. Mol.*. 344:889 (2001).
- Rimmelzwaan et al., *Vaccine*. 29:3424 (2011).
- Robertson, *Rev. Med. Virol.*, 3:97 (1993).
- Robertson et al., *J. Gen. Virol.*. 72:2671 (1991).
- Smith et al., *J. Gen. Virol.*, 68:2729 (1987).
- 40 Vesikari et al., *Pediatr. Infect. Pis. J.*. 25:590 (2006).
- Watanabe et al., *J. Virol.*. 76:767 (2002).
- Watanabe et al., *J. Virol.*, 83:5947 (2009).

Wright et al.. In Fields virology, 5th edn, pp. 1691-1740(2007). Editado por D. M. Knipe & P. M. Howley, Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers.

Yamada et al., PloSPathog., 6:e1001034 (2010).

5 Mientras en la anterior especificación, se ha descrito esta invención en relación con determinadas realizaciones preferidas de la misma, y se han dado muchos detalles a efectos de ilustración, resultará evidente para los expertos en el campo que la invención es susceptible de realizaciones adicionales, y que algunos de los detalles dados aquí pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Wisconsin Alumni Research Foundation
Kawaoka, Yoshihiro
Neumann, Gabriele
Ozawa, Makoto
- <120>VIRUS DE LA GRIPE CON SEGMENTO GÉNICO PB2 MUTANTE COMO VACUNAS VIVAS ATENUADAS
- <130> 800.084WO1
- 10 <150> US 61/527,935
<151> 2011-08-26
- <160> 16
- <170>FastSEQ para windows Version 4.0
- <210> 1
- 15 <211> 2233
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético
- 20 <400> 1

ES 2 655 051 T3

agcgaaagca	ggtactgac	caaaatggaa	gattttgtgc	gacaatgctt	caatcogatg	60
attgtcagac	ttgcggaaaa	aacaatgaaa	gagtatgggg	aggacctgaa	aatcgaaaca	120
aacaaatttg	cagcaatatg	cactcacttg	gaagtatgct	tcatgtattc	agattttcac	180
ttcatcaatg	agcaaggcga	gtcaataatc	gtagaacttg	gtgatccaaa	tgcacttttg	240
aagcacagat	ttgaaataat	cgagggaaga	gatcgacaaa	tggcctggac	agtagtaaac	300
agtatttgca	acactacagg	ggctgagaaa	ccaaagtttc	taccagattt	gtatgattac	360
aaggagaata	gattcatoga	aattggagta	acaaggagag	aagttcacat	atactatctg	420
gaaaaggcca	ataaaattaa	atctgagaaa	acacacatcc	acattttctc	gttcaactggg	480
gaagaaatgg	ccacaaaggc	agactacact	ctcgatgaag	aaagcagggc	taggatcaaa	540
accgagactat	tcaccataag	acaagaaatg	gccagcagag	gcctctggga	ttcctttogt	600
cagtcogaga	gaggagaaga	gacaattgaa	gaaaggtttg	aaatcacagg	aacaatgocg	660
aagcttgccg	accaaagtct	cccgccgaac	ttctccagcc	ttgaaaattt	tagagcctat	720
gtggatggat	tcgaaccgaa	cggtacatt	gagggcaagc	tgtctcaaat	gtccaagaa	780
gtaaatgcta	gaattgaacc	ttttttgaaa	acaacaccac	gaccacttag	acttccgaat	840
gggcctccct	gttctcagcg	gtccaaattc	ctgctgatgg	atgccttaaa	attaagcatt	900
gaggaccocaa	gtcaatgaagg	agaggggaata	cogctatatg	atgcaatcaa	atgcatgaga	960
acattctttg	gatggaagga	acccaatggt	gttaaaccac	acgaaaaggg	aataaatcca	1020
aattatcttc	tgcatggaa	gcaagtactg	gcagaactgc	aggacattga	gaatgaggag	1080
aaaattccaa	agactaaaaa	tatgaagaaa	acaagtcagc	taaagtgggc	acttgggtgag	1140
aacatggcac	cagaaaaggt	agactttgac	gactgtaaag	atgtaggtga	tttgaagcaa	1200
tatgatagtg	atgaaccaga	attgaggtcg	cttgcaagtt	ggattcagaa	tgagtttaac	1260
aaggcatgcg	aactgacaga	ttcaagctgg	atagagctcg	atgagattgg	agaagatgtg	1320
gctccaattg	aacacattgc	aagcatgaga	aggaattatt	tcacatcaga	ggtgtctcac	1380
tgacagacca	cagaatacat	aatgaagggg	gtgtacatca	atactgcctt	gcttaatgca	1440
tcttgtgcag	caatggatga	tttccaatta	attccaatga	taagcaagtg	tagaactaag	1500
gaggaagggc	gaaagaccaa	cttgtatggt	ttcatcataa	aaggaagatc	ccacttaagg	1560
aatgacaccg	acgtggtaaa	ctttgtgagc	atggagtttt	ctctcactga	cccaagactt	1620
gaaccacata	aatgggagaa	gtactgtggt	cttgagatag	gagatatgct	tataagaagt	1680
gccataggcc	aggtttcaag	gccatgttc	ttgtatgtga	gaacaaatgg	aacctcaaaa	1740
attaaaatga	aatgggggaat	ggagatgagg	cgttgccctcc	tccagtcact	tcaacaaatt	1800
gaggtatgga	ttgaaactga	gtcctctgtc	aaagagaaaag	acatgaccaa	agagtctttt	1860
gagaacaaat	cagaaacatg	gccatttggg	gagtcccca	aaggagtggg	ggaaagtctc	1920
attgggaagg	tctgcaggac	tttatttagca	aagtccgtat	tcaacagctt	gtatgcactc	1980
ccacaactag	aaggattttc	agctgaatca	agaaaactgc	ttcttatogt	tcaggctctt	2040
agggacaacc	tggaacctgg	gacctttgat	cttggggggc	tatatgaagc	aattgaggag	2100
tgcttgatta	atgatccctg	ggttttgctt	aatgcttctt	ggttcaactc	cttctttaca	2160
catgcattga	gtagtgtgtg	gcagtgctac	tatttgctat	ccatactgtc	caaaaaagta	2220
ccttgtttct	act					2233

<210> 2

<211> 2341

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un oligonucleótido sintético

10

<400> 2

ES 2 655 051 T3

```

agcgaaagca ggcaaacat ttgaatggat gtcaatccga ccttactttt cttaaaagtg 60
ccagcacaaa atgctataag cacaactttc ccttatactg gagaccctcc ttacagccat 120
gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaag 180
ggaagatgga caacaaacac cgaaactgga gcaccgcaac tcaaccogat tgatgggcca 240
ctgccagaag acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag attgtgtatt ggaggcgatg 300
gctttccttg aggaatccca tcctgggtatt ttgaaaact cgtgtattga aacgatggag 360
gttggttcagc aaacacagat agacaagctg acacaaggcc gacagaccta tgactggact 420
ctaaatagaa accaacctgc tgcaacagca ttggccaaca caatagaagt gttcagatca 480
aatggcctca cggccaatga gtctggaagg ctcatagact tccttaagga tgtaatggag 540
tcaatgaaca aagaagaaat ggggatcaca actcattttc agagaagag acgggtgaga 600
gacaatatga ctaagaaaat gataacacag agaacaatgg gtaaaaagaa gcagagattg 660
aacaaaagga gttatctaata tagagcattg acctgaaca caatgaccaa agatgctgag 720
agagggaaagc taaaacggag agcaattgca accccaggga tgcaataaag ggggtttgta 780
tactttgttg agacactggc aaggagtata tgtgagaaac ttgaacaatc aggggttgcca 840
gttggaggca atgagaagaa agcaaagtgg gcaaagtgtg taaggaagat gatgaccaat 900
tctcaggaca ccgaactttc tttcaccatc actggagata acaccaaatg gaacgaaaat 960
cagaatcctc ggatgttttt ggccatgatc acatatatga ccagaaatca gcccgatgg 1020
ttcagaaatg ttctaagtat tgctccaata atgttctcaa acaaaatggc gagactggga 1080
aaagggat a tgtttgagag caagagtatg aaacttagaa ctcaaatacc tgcagaaatg 1140
ctagcaagca tcgatttgaa atatttcaat gattcaacaa gaaagaagat tgaaaaaatc 1200
cgaccgctct taatagaggg gactgcatca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc 1260
aatatgttaa gcaactgtatt agggctctcc atcctgaatc ttggacaaaa gagatacacc 1320
aagactactt actggtggga tggcttcaa tcctctgacg attttgctct gattgtgat 1380
gcacccaatc atgaagggat tcaagccgga gtcgacaggt tttatcgaac ctgtaagcta 1440
cttggaatca atatgagcaa gaaaaagtct tacataaaca gaacaggtac atttgaattc 1500
acaagttttt tctatcgtta tgggtttggt gccaatcca gcatggagct tcccagtttt 1560
ggggtgtctg ggatcaacga gtcagcggac atgagtattg gagttactgt catcaaaaaac 1620
aatatgataa acaatgatct tggccagca acagctcaaa tggcccttca gttgttcac 1680
aaagattaca ggtacacgta ccgatgccat ataggtgaca cacaaatca aaccogaaga 1740
tcatttgaaa taaagaaact gtgggagcaa acccgttcca aagctggact gctggctctc 1800
gacggaggcc caaatata caacattaga aatctccaca ttoctgaagt ctgcctaaaa 1860
tgggaattga tggatgagga ttaccagggg cgtttatgca acccactgaa cccatttgtc 1920
agccataaag aaattgaatc aatgaacaat gcagtgatga tgccagcaca tggctcagcc 1980
aaaaacatgg agtatgatgc tgttcaaca acacactcct ggatcccaa aagaatcga 2040
tccatcttga atacaagtca aagaggagta cttgaggatg aacaaatgta ccaaaggctc 2100
tgcaatttat ttgaaaaatt cttcccagc agttcataca gaagaccagt cgggatatcc 2160
agtatggtg aggctatggt ttccagagcc cgaattgatg cacggattga tttcgaatct 2220
ggaaggataa agaaagaaga gttcactgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagag 2280
ctcagacggc aaaaatagtg aatttagctt gtcttcatg aaaaaatgcc ttgttctac 2340
t 2341

```

- <210> 3
- <211> 2341
- <212>ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

10

<400> 3

```

agcgaagca ggtcaattat attcaatat gaaagaataa aagaactacg aatcctaattg      60
tcgcagtcct caccgccgga gatactcaca aaaaccaccg tggaccatata ggccataatc      120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccagcac ttaggatgaa atggatgatg      180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aatgattcc tgagagaaat      240
gagcaaggac aaactttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtgatggta      300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggaccaa taacaaatac agttcattat      360
ccaaaaatct acaaaaactta ttttgaaga gtcgaaaggc taagcatgg aacctttggc      420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcgggagag ttgacataaa tcctgggtcat      480
gcagatctca gtgccaaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgtttt ccctaacgaa      540
gtgggagcca ggataactac atcggaaatcg caactaacga taaccaaaga gaagaaagaa      600
gaactccagc attgcaaaat ttctcctttg atggttgcac acatggttga gagagaactg      660
gtccgcaaaa cgagattcct cccagtggtc ggtggaacaa gcagtggtga cattgaagtg      720
ttgcatttga ctcaaggaac atgctgggaa cagatgtata ctccaggagg ggaagtggag      780
aatgatgatg ttgatcaaag cttgattatt gctgctagga acatagtggg aagagctgca      840
gtatcagcag atccactagc atccttattg gagatgtgcc acagcacaca gattggtgga      900
attaggatgg tagacatcct taggcagaac ccaacagaag agcaagccgt ggatatatgc      960
aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tccttcagtt ttggtggatt cacatttaag     1020
agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagaggtgc ttacgggcaa tcttcaaaaca     1080
ttgaagataa gagtgcataa gggatatgaa gatttcacaa tgggtgggag aagagcaaca     1140
gccatactca gaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg gagagacgaa     1200
cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atggtatatt cacaagagga ttgtatgata     1260
aaagcagtcg gaggtgatct gaatttcgct aatagggcga atcaacgatt gaatcctatg     1320
catcaacttt taagacattt tcagaaggat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggagtt     1380
gaacctatcg acaatgtgat gggaaatgatt gggatattgc ccgacatgac tccaagcatc     1440
gagatgtcaa tgagaggagt gagaatcagc aaaatgggtg tagatgagta ctccagcagc     1500
gagagggtag tgggtgagcat tgaccgtttt ttgagaatcc gggaccaacg aggaaatgta     1560
ctactgtctc ccgaggaggt cagtgaacaa cagggaacag agaaactgac aataacttac     1620
tcatcgtcaa tgatgtggga gattaatggt cctgaatcag tgttggtcaa tacctatcaa     1680
tggatcatca gaaactggga aactgttaaa attcagtggt ccagaaccc tacaatgcta     1740
tacaataaaa tggaaattga accatttcag tccttagtac ctaaggccat tagaggccaa     1800
tacagtggtt ttgtaagaac tctgttccaa caaatgaggg atgtgcttgg gacatttgat     1860
accgcacaga taataaaaact tcttccttc gcagccgctc caccaaagca aagtagaatg     1920
cagttctcct catttactgt gaatgtgagg ggatcaggaa tgagaatact tgtaaggggc     1980
aattctcctg tattcaacta taacaaggcc ccgaagagac tcacagttct cggaaaggat     2040
gctggcaact ttaactgaaga cccagatgaa gcacagctg gagtggagtc cgctgttctg     2100
aggggattcc tcattctggg caaagaagac aagagatatg ggccagcact aagcatcaat     2160
gaactgagca accttgcgaa aggagagaag gctaattgtc taattgggca aggagacgtg     2220
gtgttggtaa tgaaacggaa acgggactct agcatactta ctgacagcca gacagcgacc     2280
aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac     2340
t
    
```

<210> 4

<211> 1565

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un oligonucleótido sintético

10 <400> 4

```

agcaaaagca gggtagataa tcaactcactg agtgacatca aatcatggc gtctcaaggc      60
accaaacgat cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc      120
agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcacc      180
gaactcaaac tcagtgatta tgagggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga      240
atggtgctct ctgcttttga cgaaggaga aataaatacc ttgaagaaca tcccagtgcg      300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg      360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat      420
ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcattccaa tttgaaatgat      480
gcaacttatc agaggacaag agctcttgtt cgcaccggaa tggatccag gatgtgctct      540
ctgatgcaag gttcaactct cctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga      600
gttgaacaa tggatgatgga attggtcaga atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaa      660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt      720
    
```

ES 2 655 051 T3

```

ctcaaaagga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc 780
cggaacccag ggaatgctga gttcgaagat ctccacttttc tagcacggtc tgcactcata 840
ttgagaggggt cggttgctca caagtctctgc ctgcctgcct gtgtgtatgg acctgccgta 900
gccagtggggt acgactttga aagggagggg tactctctag tcggaataga ccctttcaga 960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag 1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgcatttg aagatctaag agtattaagc 1080
ttcatcaaaag ggacgaaggt gctcccaaga gggaaagcttt ccactagagg agttcaaatt 1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaaactgag aagcaggtac 1200
tggggcataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agaggggcatc tgggggcca 1260
atcagcatac aacctacgtt ctcaatcagc agaaatctcc cttttgacag aacaaccatt 1320
atggcagcat tcaatgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaaatcata 1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggggggg agtcttcgag 1440
ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttctc ttgacatgag taatgaagga 1500
tcttatttct tcggagacaa tgcagagggg tacgacaatt aaagaaaaat acccttgttt 1560
ctact

```

- <210> 5
- <211> 1027
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

<400> 5

```

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag ttttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact 60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120
tgcagggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg 240
aggactgca gtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa 300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc 360
caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcacttggc agttgtatgg gcoctatata 420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga 480
acagattgct gactcccagc atcgggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact 540
aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat 600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagttagg ctagacaaat 660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcoctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga 720
tcttctgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780
gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcaactgaca ttgtggattc 840
ttgatcgtct tttttcaaa tgcatttacc gtgcctttaa atacggactg aaaggagggc 900
cttctacgga aggagtgcca aagtctatga gggagaataa tcgaaaaggaa cagcagatg 960
ctgtggatgc tgacgatggc cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020
ttctact 1027

```

- 10
- <210> 6
- <211> 890
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

<400> 6

```

agcaaaagca gggtgacaaa aacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag 60
attgcttctt ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggc gatgccccat 120
tcocttgatg gcttcgcca gatcagaaat ccoctaagagg aaggggcagt actctcggtc 180
tggacatcaa gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag 240
aatcogatga ggcaactaaa atgaccatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaactg 300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggact ggtccatgct catacccaag cagaaagtgg 360
caggcoctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgga taagaacatc atactgaaag 420
ogaacttcag tgtgattttt gaccggctgg agactctaatt attgctaagg gctttcaccg 480
aagagggagc aattgtggc gaaatttcac cattgccttc tcttcagga catactgctg 540
aggatgtcaa aaatgcagtt ggagtctca tcggaggact tgaatggaat gataacacag 600

```

20

ES 2 655 051 T3

ttcaggtctc	tgaaaactcta	cagagattcg	cttgggagaag	cagtaatgag	aatgggagac	660
ctccactcac	tccaaaacag	aaacgagaaa	tggcgggaac	aattaggtca	gaagtttgaa	720
gaaataagat	ggttgattga	agaagtgaga	cacaaactga	agataacaga	gaatagtttt	780
gagcaaaata	catttatgca	agccttacat	ctattgcttg	aagtggagca	agagataaga	840
actttctcgt	ttcagcttat	ttagtactaa	aaaacaccct	tgtttctact		890

- <210> 7
- <211> 1775
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

<400> 7

agcaaaaagca	ggggaaaata	aaaacaacca	aatgaaggc	aaacctactg	gtcctgttat	60
gtgcacttgc	agctgcagat	gcagacacaa	tatgtatagg	ctaccatgcg	aacaattcaa	120
ccgacactgt	tgacacagta	ctcgagaaga	atgtgacagt	gacacactct	gttaacctgc	180
togaagacag	ccacaacgga	aaactatgta	gattaaaagg	aatagcccca	ctacaattgg	240
ggaaatgtaa	catcgccgga	tggtccttgg	gaaacccaga	atgcgaccca	ctgcttccag	300
tgagatcatg	gtcctacatt	gtagaaacac	caaactctga	gaatggaata	tgttatccag	360
gagatttcat	cgactatgag	gagctgaggg	agcaattgag	ctcagtgtca	tcattcgaaa	420
gattcgaaat	atctccaaa	gaaagctcat	ggcccaacca	caacacaaac	ggagtacgg	480
cagcatgctc	ccatgagggg	aaaagcagtt	tttacagaaa	tttgctatgg	ctgacggaga	540
aggagggctc	atacccaaag	ctgaaaaatt	cttatgtgaa	caaaaaagg	aaagaagtcc	600
ttgtactgtg	gggtattcat	caccoccta	acagtaagga	acaacagaat	ctctatcaga	660
atgaaaatgc	ttatgtctct	gtagtgactt	caaattataa	caggagattt	accccgaaa	720
tagcagaaag	acccaaagta	agagatcaag	ctgggaggat	gaactattac	tggaccttgc	780
taaaacccgg	agacacaata	atatttgagg	caaattgaaa	tctaatagca	ccaatgtatg	840
ctttcgact	gagtagaggg	tttgggtccg	gcatcatcac	ctcaaacgca	tcaatgcatg	900
agtgtaacac	gaagtgtcaa	acaccctgg	gagctataaa	cagcagtctc	ccttaccaga	960
atatacacc	agtcacaata	ggagagtgcc	caaaatacgt	caggagtgcc	aaattgagga	1020
tggttacagg	actaaggaac	attccgtcca	ttcaatccag	aggtctattt	ggagccattg	1080
ccggttttat	tgaaggggga	tggactggaa	tgatagatgg	atggtatggt	tatcatcatc	1140
agaatgaaca	gggatcaggg	tatgcagcgg	atcaaaaaag	cacacaaaat	gccattaacg	1200
ggattacaaa	caaggtgaac	actggtatcg	agaaaatgaa	cattcaattc	acagctgtgg	1260
gtaaagaatt	caacaaatta	gaaaaaagga	tggaaaattt	aaataaaaaa	gttgatgatg	1320
gatttctgga	catttggaca	tataatgcag	aattgttagt	tctactggaa	aatgaaagga	1380
ctctggattt	ccatgactca	aatgtgaaga	atctgtatga	gaaagtaaaa	agccaattaa	1440
agaataatgc	caaagaaatc	ggaaatggat	gtttttagtt	ctaccacaag	tgtgacaatg	1500
aatgcattgga	aagtgtgaaga	aatgggactt	atgattatcc	caaatattca	gaagagtcaa	1560
agttgaacag	ggaaaaggta	gatggagtga	aattggaatc	aatggggatc	tatcagattc	1620
tggcgatcta	ctcaactgtc	gccagttcac	tgggtccttt	ggtctccttg	ggggcaatca	1680
gtttctggat	gtgttcta	ggatctttgc	agtgcagaat	atgcatctga	gattagaatt	1740
tcagagatat	gaggaaaaac	acccttgttt	ctact			1775

- 10
- <210> 8
- <211> 1413
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

<400> 8

agcaaaaagca	ggggtttaa	atgaatccaa	atcagaaaat	aataaccatt	ggatcaatct	60
gtctggtagt	cggactaatt	agcctaata	tgcaaatagg	gaatataatc	tcaatattgga	120
ttagccattc	aattcaaaact	ggaagtcaaa	accatactgg	aatatgcaac	caaaacatca	180
ttacctataa	aaatagcacc	tgggtaaagg	acacaacttc	agtgatatta	accggcaatt	240
catctctttg	tccactcogt	gggtgggcta	tatacagcaa	agacaatagc	ataagaattg	300
gttccaaagg	agaogttttt	gtcataagag	atccctttat	ttcatgtttc	cacttggaa	360
gcaggacctt	ttttctgacc	caaggtgcct	tactgaatga	caagcattca	agtgggactg	420
ttaaggacag	aagcccttat	agggccttaa	tgagctgccc	tgtcgggtgaa	gctccgtccc	480

20

ES 2 655 051 T3

```

cgtacaattc aagatttgaa tcggttgctt ggtcagcaag tgcattgtcat gatggcatgg 540
gctggctaac aatcgggaatt tcagggtccag ataatggagc agtggctgta ttaaaataca 600
acggcataat aactgaaacc ataaaaagtt ggaggaagaa aatattgagg acacaagagt 660
ctgaatgtgc ctgtgtaaat ggttcatggt ttactataat gactgatggc ccgagtgatg 720
ggctggcctc gtacaaaatt ttcaagatcg aaaaggggaa ggttactaaa tcaatagagt 780
tgaatgcacc taattctcac tatgaggaat gttcctgtta ccctgatacc ggcaaagtga 840
tgtgtgtgtg cagagacaat tggcatgggt cgaaccggcc atgggtgtct ttcgatcaaa 900
acctggatta tcaaatagga tacatctgca gtggggtttt cggtgacaac ccgctccc 960
aagatggaac aggcagctgt ggtccagtgt atggtgatgg agcaaacgga gtaaagggat 1020
tttcatatag gtatggtaat ggtgtttgga taggaaggac caaaagtcc agttccagac 1080
atgggttga gatgatttg gatcctaag gatggacaga gactgatagt aagttctctg 1140
tgaggcaaga tgttgtggca atgactgatt ggtcagggt tagcggagt ttcgttcaac 1200
atcctgagct gacagggcta gactgtatga ggccgtgct ctgggttga ttaatcaggg 1260
gacgacctaa agaaaaaca atctggacta gtgcgagcag catttcttt tgtggcgtga 1320
atagtatac tgtagattgg tottggccag acggtgtga gttgccattc agcattgaca 1380
agtagtctgt tcaaaaact ccttgtttct act 1413

```

- <210> 9
- <211> 24
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

10 <400> 9

atggaaagaa taaaagaact acga

24

- <210> 10
- <211> 2341
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

20 <400> 10

```

agcgaaagca ggtcaattat attcaatat gaaagaataa aagaactaag aaatctaattg 60
tcgcagttct gcaccgcgga gatactcaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc 120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccagcac ttaggatgaa atggatgatg 180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aaatgattcc tgagagaaat 240
gagcaaggac aaactttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtgatggta 300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggaccaa tgacaaatac agttcattat 360
ccaaaaatct acaaaaacta ttttgaaga gtcgaaaggc taagcatgg aaccttggc 420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcggagag ttgacataaa tctcgtgcat 480
gcagatctca gtgccaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgttt ccctaacgaa 540
gtgggagcca ggataactaac atcggaatcg caactaacga taaccaaaga gaagaaagaa 600
gaactccagg attgcaaaat ttctcctttg atggttgcat acatgttgg gagagaactg 660
gtccgcaaaa cgagattcct cccagtggct ggtggaacaa gcagtgtgta cattgaagtg 720
ttgcatttga ctcaaggaac atgctgggaa cagatgtata ctccaggagg ggaagtgaag 780
aatgatgatg ttgatcaaag cttgattatt gctgctagga acatagtgag aagagctgca 840
gtatcagcag acccactagc atctttattg gagatgtgcc acagcacaca gattggtgga 900
attaggatgg tagacatcct taagcagaac ccaacagaag agcaagccgt ggataatgca 960
aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tcttccagt ttggtggatt cacatttaag 1020
agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagaggtgc ttacgggcaa tcttcaaaaca 1080
ttgaagataa gagtgcataa gggatctgaa gatttcacaa tgggtgggag aagagcaaca 1140
gccatactca gaaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg gagagacgaa 1200
cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atggtathtt cacaagagga ttgtatgata 1260
aaagcagtta gagtgatct gaatttcgtc aatagggcga atcagcgact gaatcctatg 1320
catcaacttt taagacattt tcagaaggat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggagtt 1380
gaacctatcg acaatgtgat gggaatgatt gggatattgc ccgacatgac tccaagcatc 1440
gagatgtcaa tgagaggagt gagaatcagc aaatgggtg tagatgagta ctccaagcag 1500
gagagggtag tggtagcat tgaccggttc ttgagagtca gggaccaacg aggaaatgta 1560

```

ES 2 655 051 T3

```

ctactgtctc ccgaggaggt cagtgaaca cagggaaacag agaaactgac aataacttac 1620
tcctcgtcaa tgatgtggga gattaatggt cctgaatcag tgttgggtcaa tacctatcaa 1680
tggatcatca gaaactggga aactgttaa attcagtggt cccagaacc tacaatgcta 1740
tacaataaaa tggaatttga accatttcag tcttttagtac ctaaggccat tagaggccaa 1800
tacagtgggt ttgtaagaac tctgttccaa caaatgaggg atgtgcttgg gacatttgat 1860
accgcacaga taataaaact tcttcccttc gcagccgctc caccaaagca aagtagaatg 1920
cagttctcct catttactgt gaatgtgagg ggatcaggaa tgagaatact tgtaaggggc 1980
aattctcctg tattcaacta caacaaggcc acgaagagac tcacagttct cggaaaggat 2040
gctggcactt taaccgaaga cccagatgaa ggcacagctg gagtggagt cgtgttctg 2100
aggggattcc tcattctggg caaagaagac aggagatatg ggccagcatt aagcatcaat 2160
gaactgagca accttgcgaa aggagagaag gctaattgtc taattgggca aggagacgtg 2220
gtgttggtaa tgaaacgaaa acgggactct gcatacttta ctgacagcca gacagcgacc 2280
aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac 2340
t

```

- <210> 11
- <211> 2341
- <212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Un oligonucleótido sintético

10 <400> 11

```

agcgaagca ggcaaacat ttgaatgat gtcaatcga ccttactttt cttaaaagtg 60
ccagcaciaa atgctataag cacaactttc ccttataccg gagaccctcc ttacagccat 120
gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaag 180
ggaagatgga caacaaacac cgaactgga gcaccgcaac tcaaccggat tgatgggcca 240
ctgccagaag acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag attgtgtatt ggaagcaatg 300
gcttctcctg aggaatccca tcttggtatt ttgaaaact cgtgtattga aacgatggag 360
gttgttcagc aaacacgagt agacaagctg acacaaggcc gacagacctg tgactggact 420
ttaaatagaa accagcctgc tgcaacagca ttggccaaca caatagaagt gttcagatca 480
aatggcctca cggccaatga gtcaggaagg ctcatagact tccttaagga tgtaatggag 540
tcaatgaaa aagaagaaat ggggatcaca actcattttc agagaagag acgggtgaga 600
gacaatatga ctaaagaaat gataacacag agaacaatag gtaaaaggaa acagagattg 660
aacaaaaggg gttatctaata tagagcattg accctgaaca caatgacca agatgctgag 720
agagggagc taaaacggag agcaattgca accccaggga tgcaataag ggggtttgta 780
tactttgttg agacactggc aaggagtata tgtgagaaac ttgaacaatc aggggtgcca 840
gttggaggca atgagaagaa agcaaatgtg gcaaatgttg taaggaagat gatgaccaat 900
tctcaggaca ccgaactttc tttcacctc actggagata acaccaaatg gaacgaaaat 960
cagaatcctc ggatgttttt ggccatgatc acatataatga ccagaaatca gcccgaaatg 1020
ttcagaaatg ttctaagtat tgctccaata atgttctcaa acaaaatggc gagactggga 1080
aaagggatata tgtttgagag caagagtatg aaacttagaa ctcaaatacc tgcagaaatg 1140
ctagcaagca ttgatttgaa atatttcaat gattcaacaa gaaagaagat tgaaaaaatc 1200
cgaccgctct taatagagg gactgcatca ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc 1260
aataatgtaa gcaactgtatt aggcgtctcc atcctgaatc ttggacaaa gagatacacc 1320
aagactactt actgggtggga tggctctcaa tcctctgacg attttgcctt gattgtgaat 1380
gcaccaatc atgaagggat tcaagccgga gtcgacagg tttatcgaac ctgtaagcta 1440
cttggaaatca atatgagcaa gaaaaagtct tacataaaca gaacaggta atttgaatc 1500
acaagttttt tctatcgtta tgggtttgtt gccaatttca gcatggagct tcccagtttt 1560
gggtgtctg ggatcaacga gtcagcggac atgagtattg gagttactgt catcaaaaac 1620
aatatgataa acaatgatct tgggtccagca acagctcaa tggcccttca gtgttctatc 1680
aaagattaca ggtcacagta ccgatgccat agaggtgaca cacaaataca aaccogaaga 1740
tcatttgaaa taagaanaact gtgggagcaa acccgttcca aagctggact gctggctctc 1800
gacggaggcc caaatttata caacattaga aatctccaca ttctgaagt ctgcctaaaa 1860
tggaattgga tggatgagga ttaccagggg cgtttatgca accoactgaa cccatttgtc 1920
agccataaag aaattgaatc aatgaacaat gcagtgatga tgccagcaca tgggtccagcc 1980
aaaaacatgg agtatgatgc tgttgcaaca acacactcct ggatcccaa aagaaatoga 2040
tccatcttga atacaagtca aagaggagta cttgaagatg aacaaatgta ccaaagggtc 2100
tgcaatttat ttgaaaatc cttcccagc agttcataca gaagaccagt cgggatatcc 2160
agtatgggtg aggtatgggt ttccagagcc cgaattgatg cacggattga tttcgaatct 2220
ggaaggataa agaaagaaga gttcactgag atcatgaaga tctgtccac cattgaagag 2280
ctcagacggc aaaaatagtg aatttagctt gtccttcag aaaaaatgcc ttgtttctac 2340

```

t

2341

<210> 12

<211> 2233

<212> ADN

5 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223> Un oligonucleótido sintético

<400> 12

```

agcgaaagca ggtactgatt caaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatcogatg      60
attgtcogagc ttgoggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca      120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc agatttccac      180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatcctaa tgcacttttg      240
aagcacagat ttgaaataat cgaggggaaga gatcgacaaa tggcctggac agtagtaaac      300
agtatttgca acactacagg ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt gtatgattac      360
aaggaaaaa gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg      420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcactggg      480
gaagaaatgg ccacaagggc cgactacact ctogatgaag aaagcagggc taggatcaaa      540
accaggctat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga ttcctttcgt      600
cagtcogaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aaatcacagg aacaatggc      660
aagcttgccg accaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat      720
gtggatggat tcgaaccgaa cggctacatt gagggcaagc tgtctcaaat gtccaaagaa      780
gtaaatgcta gaattgaacc ttttttghaa acaacaccac gaccacttag acttcogaat      840
gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaa attaagcatt      900
gaggacccaa gtcatgaagg agaggggaata ccgctatatg atgcaatcaa atgcatgaga      960
acattctttg gatggaagga acccaatggt gttaaaccac acgaaaaggg aataaatcca     1020
aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag     1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaaaaaa acaagtcagc taaagtgggc acttgggtgag     1140
aacatggcac cagaaaaggt agactttgac gactgtaaag atgtaggtga tttgaagcaa     1200
tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg cttgcaagtt ggattcagaa tgagtcaac     1260
aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg atagagcttg atgagattgg agaagatgtg     1320
gctccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac     1380
tgcagagcca cagaatacat aatgaagggg gtgtacatca atactgcctt acttaatgca     1440
tcttgtgcag caatggatga tttccaatta attccaatga taagcaagtg tagaactaag     1500
gagggaaagg gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aaggaagatc ccacttaagg     1560
aatgacaccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagttt ctctcactga cccaagactt     1620
gaaccacaca aatgggagaa gtactgtggt cttgagatag gagatatgct tctaagaagt     1680
gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgtga ggacaaatgg aacctcaaaa     1740
atataaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgtctcc tccagtcact tcaacaaatt     1800
gagagtatga ttgaagctga gtccctctgtc aaagagaaag acatgaccaa agagtcttt     1860
gagaacaaat cagaaacatg gccatttga gagtctcca aaggagtgga ggaaagtcc     1920
attgggaagg tctgcaggac tttattagca aagtcggtat ttaacagctt gtatgcattc     1980
ccacaactag aaggattttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt tcaggctctt     2040
agggacaatc tggaacctgg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc aattgaggag     2100
tgctaatta atgatccctg ggttttgctt aatgctctt ggttcaactc cttcattaca     2160
catgcattga gttagtgtg gcagtgctac tatttgctat ccatactgc caaaaaagta     2220
ccttgtttct act
    
```

10 <210> 13

<211> 1565

<212> ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223> Un oligonucleótido sintético

<400> 13

```

agcaaaagca gggtagataa tcaactcactg agtgacatca aatcatggc gtcccaaggc      60
accaaaagggt cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc      120
agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcaca      180
gaacttaaac tcagtgatta tgagggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga      240

atggtgctct ctgcttttga cgaaggaga aataaatacc tggaagaaca tccaagtgcg      300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagaa gagtaaacgg aaagtggatg      360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcga tctggcgcca agctaaataat      420
ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcattccaa tttgaatgat      480
gcaacttatc agaggacaag ggctcttgtt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct      540
ctgatgcaag gttcaactct cctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga      600
gttggaacaa tggatgagga attggtcagg atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac      660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt      720
ctcaaaaggg aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc      780
cggaaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctcaactttc tagcacggtc tgcaactcata      840
ttgagagggg cggttgctca caagtctctc ctgectgect gtgtgtatgg acctgcccga      900
gccagtgggt acgactttga aagagagggg tactctctag toggaaataga cctttcaga      960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag     1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgcatctg aagatctaag agtattgagc     1080
ttcatcaaa ggcgaaggt ggtcccaaga ggaagcttt ccactagagg agttcaaatt     1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatgga tcaagtacac ttgaaactgag aagcaggtag     1200
tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agagggcatc tgccggccaa     1260
atcagcatac aacctacgtt ctcagtacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt     1320
atggcagcat tcaactgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaatcata     1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag     1440
ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttctc ttgacatgag taatgaagga     1500
tcttatttct tcgagacaa tgcagaggag tacgacaatt aaagaaaaat accttggtt     1560
ctact
    
```

5 <210> 14

<211> 1027

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Un oligonucleótido sintético

<400> 14

```

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag ttttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct      60
ctctatcatc ccgtcaggcc cctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt      120
tgcagggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct      180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccogtgc ccagtgagcg      240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaa tgccctaat ggaacgggg atccaaataa      300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc      360
caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcacttgc agttgtatgg gctcatata      420
caacaggatg ggggctgtga ccaactgaag ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga      480
acagattgct gactcccagc atcgggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaaccact      540
aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat      600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcaag ctaggcaaat      660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcttagctcc agtgcctggtc tgaaaatga      720
tcttcttgaa aattttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa      780
gtgatcctct cgtattggc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgata ttgtggattc      840
ttgatcgtct tttttcaaa tgcatttacc gtcgcttaa atacggactg aaaggagggc      900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga ggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg      960
ctgtggatgc tgacgatggc cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actacctgtg     1020
ttctact
    
```

<210> 15

ES 2 655 051 T3

<211> 890
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Un oligonucleótido sintético

<400> 15

```

agcaaaagca ggggtgacaaa gacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag      60
attgctttct ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggt gatgccccat      120

tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagc actcttggtc      180
tggacatcga gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag      240
aatccgatga ggcacttaaa atgacatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaaccg      300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggaaat ggtccatgct catacccaag cagaaagtgg      360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgga taaaaacatc atactgaaag      420
cgaacttcag tgtgattttt gaccggctgg agactcta attgctaagg gctttcacccg      480
aagaggggagc aattgttggc gaaattcac cattgccttc tcttccagga catactgctg      540
aggatgtcaa aaatgcagt ggagtcctca tggaggact tgaatggaat gataacacag      600
ttcgagtctc tgaaactcta cagagattcg cttggagaag cagtaatgag aatgggagac      660
ctccactcac tccaaaacag aaacgagaaa tggcgggaac aattaggtca gaagtgtgaa      720
gaaataagat ggttgattga agaagtgaga cacaactga aggtaacaga gaatagtttt      780
gagcaataaa catttatgca agccttacat ctattgcttg aagtggagca agagataaga      840
actttctcat ttcagcttat ttaataataa aaaacacct tgtttctact      890
    
```

<210> 16

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un oligonucleótido sintético

<400> 16

```

gccacaatta ttgcttcggc      20
    
```

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna comprendiendo una cantidad efectiva de un virus de la gripe aislado biológicamente contenido, comprendiendo: i) 8 segmentos génicos distintos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y M2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2), ii) 8 segmentos génicos virales distintos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA (NA y NB), un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y BM2) y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2), o iii) 7 segmentos génicos distintos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HEF, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y CM2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2);
- 5 donde el segmento génico viral PB2 mutante incluye secuencias de incorporación no codificantes y codificantes virales PB2 5' y 3' flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondiendo a secuencias codificando un PB2 funcional,
- 10 donde la secuencia de nucleótidos heteróloga es un gen que codifica una proteína antigénica heteróloga.
- 15 2. Un virus de la gripe aislado contenido biológicamente para su uso en terapia, comprendiendo: i) 8 distintos segmentos génicos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y M2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2), ii) 8 distintos segmentos génicos incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HA, un segmento génico viral NA (NA y NB), un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y BM2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2), o iii) 7 distintos segmentos génicos, incluyendo un segmento génico viral PA, un segmento génico viral PB1, un segmento génico viral PB2 mutante, un segmento génico viral HEF, un segmento génico viral NP, un segmento génico viral M (M1 y CM2), y un segmento génico viral NS (NS1 y NS2);
- 20 donde el segmento génico viral PB2 mutante incluye secuencias de incorporación no codificantes y codificantes virales PB2 5' y 3', flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga, y no incluye secuencias contiguas correspondiendo a secuencias que codifican un PB2 funcional,
- 25 donde la secuencia de nucleótidos heteróloga es un gen que codifica a una proteína antigénica heteróloga para la mencionada terapia.
- 30 3. El virus de la reivindicación 2 donde la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende secuencias de una glicoproteína.
4. La vacuna 1 de la reivindicación 1 donde la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende secuencias de una glicoproteína.
- 35 5. La vacuna de la reivindicación 1 donde el virus recombinante comprende un segmento génico HA para virus de la gripe A HA, donde el HA es opcionalmente H1, H2, H3, H5, H7, o H9 HA, y también opcionalmente donde la HA en el virus recombinante es modificada en el punto de escisión HA.
6. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, comprendiendo además un virus de la gripe distinto y opcionalmente dos virus de la gripe diferentes.
- 40 7. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su uso en un método de inmunización de un vertebrado, opcionalmente un ave o un mamífero, particularmente un humano.
8. Una células huésped comprendiendo un vector expresando un virus de la gripe como se define en la reivindicación 2, donde el virus es virus de la gripe PB2 cuyo vector está integrado establemente en el genoma de la célula huésped, y opcionalmente comprendiendo además uno o más vectores que incluyen cassettes de transcripción para la producción de vARN, y cassettes de transcripción para la producción de mARN,
- 45 donde las cassettes de transcripción para la producción de vARN son cassettes de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN PA de virus de la gripe, en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN PB1 de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN PB2 de virus de la gripe mutante en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN HA de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN NA de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN NP de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción
- 50
- 55

comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN M de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN NS (NS1 y NS2) de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, donde el ADN PB2 mutante incluye secuencias de incorporación de PB2 viral no codificantes y codificantes 5' y 3' flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga codificando la proteína heteróloga, proteína que opcionalmente induce una respuesta inmune profiláctica o terapéutica a un patógeno, y no incluye secuencias contiguas correspondiendo a secuencias que codifican un PB2 funcional; y

donde las cassettes de transcripción para la producción de mARN son cassettes de transcripción comprendiendo una promotor PoIII unido funcionalmente a una región de codificación de ADN para virus de la gripe PA unidos a una secuencia de terminación de transcripción PoIII, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor PoIII unido funcionalmente a una región codificante de ADN para virus de la gripe PB1 unido a una secuencia de terminación de transcripción PoIII, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor PoIII unido funcionalmente a una región de codificación de ADN para virus de la gripe NP unido a una terminación de transcripción PoIII,

donde la célula huésped no comprende secuencias correspondiendo a secuencias de codificación PB2 para la producción de vARN de un segmento génico PB2 tipo salvaje.

9. La célula huésped de la reivindicación 8 es una célula 293, una célula 293T, una célula DF-1, una célula A549, una célula Vero o una célula MDCK.

10. Un método para preparar un virus de la gripe contenido biológicamente para el uso de la reivindicación 2, cuyo virus es un virus de la gripe de 8 segmentos A o B, comprendiendo contactar a una célula huésped con uno o más vectores que incluyen cassettes de transcripción para la producción de vARN, y cassettes de transcripción para la producción de mARN, donde las cassettes de transcripción para la producción de vARN son cassettes de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN PA de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN PB1 de un virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN PB2 de virus de la gripe mutante en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN HA de un virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido operativamente a un ADN NA de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN NP de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN M de virus de la gripe en una orientación con la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor Poll unido funcionalmente a un ADN NS (NS1 y NS2) de virus de la gripe en una orientación para la producción de vARN unido a una secuencia de terminación de transcripción Poll, donde el ADN PB2 mutante incluye secuencias de incorporación PB2 viral no codificantes y codificantes 5' y 3' flanqueando una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la proteína heteróloga, cuya proteína induce opcionalmente una respuesta inmune profiláctica o terapéutica a un patógeno y no incluye secuencias contiguas correspondiendo a secuencias que codifican un PB2 funcional; y donde las cassettes de transcripción para la producción de mARN son cassettes de transcripción comprendiendo un promotor PoIII unido funcionalmente a una región codificante de ADN para virus de la gripe PA unido a una secuencia de terminación de transcripción PoIII, una cassette de transcripción comprendiendo un promotor PoIII unido funcionalmente a una región codificante de ADN para virus de la gripe PB1 unido a una secuencia de terminación de transcripción PoIII, y una cassette de transcripción comprendiendo un promotor PoIII unido funcionalmente a una región codificante de ADN para virus de la gripe NP unido a una secuencia de terminación de transcripción PoIII, donde el genoma de célula huésped es aumentado establemente con una cassette de transcripción comprendiendo un promotor PoIII unido funcionalmente a una región codificante de ADN para virus de la gripe PB2 unido a una secuencia de terminación de transcripción PoIII, y donde la célula huésped no comprende secuencias correspondiendo a secuencias codificantes PB2 para la producción de vARN de un segmento génico PB2 de tipo salvaje; y aislando el virus contenido biológicamente de la célula huésped.

11. El método de la reivindicación 10 donde el virus biológicamente contenido es reordenante 6:2.

12. El método de la reivindicación 10 donde la HA es una HA tipo A o una HA tipo B, y opcionalmente la HA tipo A es HA H1, H2, H3, H5, H7, o H9.

13. El método de la reivindicación 10 donde cADN HA codifica a un punto de escisión avirulento.

14. El método de la reivindicación 10 donde la HA y la NA son del mismo aislado de virus.

15. Un método para detectar anticuerpos neutralizantes para una cepa de virus de la gripe seleccionada en una muestra fisiológica de un vertebrado, comprendiendo:

a) contactar la muestra, el virus de la reivindicación 2 que expresa HA y/o NA de la cepa seleccionada, y células susceptibles de infección por virus de la gripe; y

5 b) detectar la presencia o cantidad del antígeno en las células, donde la ausencia del antígeno o una cantidad reducida del antígeno en la muestra en relación con una muestra control, indica un vertebrado que ha sido infectado por la cepa del virus de la gripe.

10

15

20

25

30

35

40

ES 2 655 051 T3

vARNs PB2 mutantes		Número de VLPs (/ml)	Número de VLPs. con vARN GFP(/ml)	Eficiencia de incorporación a viriones	
3'	5'				
PB2(300)GFP (300)	300	300	2.799.200	1.532.400	54,7%
PB2(120)GFP (120)	120	120	1.080.800	753.600	69,7%
PB2(60)GFP (120)	60	120	1.676.800	960.000	57,3%
PB2(30)GFP (120)	30	120	1.807.200	839.200	46,4%
PB210)GFP (120)		120	1.093.600	322.400	29,5%
PS2(120)GFP (60)	120	60	1.756.800	1.132.800	64,5%
PB2(120)GFP (30)	120	30	1.068.000	549.000	51,5%
PB2(120)GFP (0)	120		55.000	42.400	75,7%
PB2(0)GFP(0)			28.000	0	0 0%
PB2(-)	Ninguno		19.600		

FIG 1.

FIG 2.

ID SEC. Nº: 1

agcgaagca	ggtactgatc	caaaatggaa	gattttgtgc	gacaatgctt	caatccgatg	60
attgtcgagc	ttgcggaaaa	aacaatgaaa	gagtatgggg	aggacctgaa	aatcgaaaca	120
aacaaatttg	cagcaatatg	cactcacttg	gaagtatgct	tcatgtatcc	agattttcac	180
ttcatcaatg	agcaaggcga	gtcaataatc	gtagaacttg	gtgatccaaa	tgcacttttg	240
aagcacagat	ttgaaataat	cgaggggaaga	gatcgacaaa	tggcctggac	agttagtaaac	300
agtattttgca	acactacagg	ggctgagaaa	ccaaagtttc	taccagattt	gtatgattac	360
aaggagaata	gattcatcga	aattggagta	acaaggagag	aagttcacat	atactatctg	420
gaaaaggcca	ataaaattaa	atctgagaaa	acacacatcc	acattttctc	gttccactggg	480
gaagaaatgg	ccacaaaggc	agactacact	ctcgatgaag	aaagcagggc	taggatcaaa	540
accagactat	tcaccataag	acaagaaatg	gccagcagag	gcctctggga	ttcctttcgt	600
cagtcocgaga	gaggagaaga	gacaattgaa	gaaaggtttg	aaatcacagg	aacaatgggc	660
aagcttgcgg	accaaagtct	ccgcgcgaac	ttctccagcc	ttgaaaattt	tagagcctat	720
gtggatggat	togaaccgaa	cggtacatt	gagggcaagc	tgtctcaaat	gtccaaagaa	780
gtaaatgcta	gaattgaacc	ttttttgaaa	acaacaccac	gaccacttag	acttccgaat	840
gggctccct	gttctcagcg	gtccaaattc	ctgctgatgg	atgccttaaa	attaagcatt	900
gaggaccocaa	gtcatgaagg	agagggaaata	ccgctatatg	atgcaatcaa	atgcatgga	960
acattctttg	gatggaagga	acccaatggt	gttaaaccac	acgaaaaggg	aataaatcca	1020
aattatcttc	tgtcatggaa	gcaagtactg	gcagaactgc	aggacattga	gaatgaggag	1080
aaaattccaa	agactaaaaa	tatgaagaaa	acaagtcagc	taaagtgggc	acttgggtgag	1140
aacatggcac	cagaaaaggt	agactttgac	gactgtaaa	atgtaggtga	tttgaagcaa	1200
tatgatagtg	atgaaccaga	attgaggtcg	cttgcaagtt	ggattcagaa	tgaattaac	1260
aagcatggcg	aactgacaga	ttcaagctgg	atagagctcg	atgagattgg	agaagatgtg	1320
gctocaaattg	aacacattgc	aagcatgaga	aggaattatt	tcacatcaga	ggtgtctcac	1380
tgcagagcca	cagaatacat	aatgaagggg	gtgtacatca	atactgcctt	gcttaatgca	1440
tcttgtgcag	caatggatga	ttccaatta	attocaaatga	taagcaagtg	tagaactaag	1500
gagggaaaggc	gaaagaccaa	cttgtatggt	ttcatcataa	aaggaagatc	ccacttaagg	1560
aatgacaccg	acgtggtaaa	ctttgtgagc	atggagtttt	ctctcactga	cccaagactt	1620
gaaccacata	aatgggagaa	gtactgtggt	cttgagatag	gagatatgct	tataagaagt	1680
gccataggcc	aggtttcaag	gcccatggtc	ttgtatgtga	gaacaaatgg	aacctcaaaa	1740
attaaaatga	aatggggaat	ggagatgagg	cgttgcctcc	tccagtcact	tcaacaaatt	1800
gagagtatga	ttgaagctga	gtcctctgtc	aaagagaaa	acatgaccaa	agagttcttt	1860
gagaacaaat	cagaaacatg	gcccatggga	gagtcoccca	aaggagtggg	ggaaagtctc	1920
attgggaagg	tctgcaggac	tttattagca	aagtgggtat	tcaacagctt	gtatgcattc	1980
ccacaactag	aaggattttc	agctgaatca	agaaaactgc	ttcttatcgt	tcaggctctt	2040
agggacaacc	tggaaacctg	gacctttgat	cttggggggc	tatatgaagc	aattgaggag	2100
tgcctgatta	atgatecctg	ggttttgctt	aatgcttctt	ggttcaactc	cttcttaca	2160
catgcattga	gttagttgtg	gcagtgtctc	tatttgcctt	ccatartgtc	caaaaaagta	2220
ccttgtttct	act					2233

ID SEC. Nº: 2

agcgaagca	ggcgaaccat	ttgaatggat	gtcaatccga	ctttactttt	cttaaaaagtg	60
ccagpacaaa	atgctataag	cacaactttc	ctttatctctg	gagaccctcc	ttacagccat	120
gggacaggaa	caggatcac	catggatact	gtcaaacagga	caatccagta	ctcagaaaag	180
ggaagctgga	caacaaacac	cgaactgga	gcaccgcac	tcaaccogat	tgatgggcca	240
ctgcaagaa	acaatgaacc	aagtgggtat	gcccacacag	attgkgtall	ggaggccgatg	300
gctttccttg	aggaatcccc	tcctgggtat	tttgaaaact	cggttatgga	aacgatggag	360
gttcttcagc	aacacagagt	agacaagctg	acacaaggct	gacagacctt	tgactggact	420
ctaaatagaa	acaacactgc	tgcaacagca	ttggccacaa	caatagaggt	gttccagatca	480
aatggcctca	cggtcaatga	gtctggaaag	ctcatagaact	cccttaagga	tgaaatggag	540
tcaatgaacc	agagagaaat	ggggatcacc	actcaatttc	agagaaagag	acgggtggga	600
gacaatatga	ctangaaat	gataacacag	agaacaaatgg	gttaaaagaa	gcagagattg	660
aacaaaagga	gttatctaat	tagagcattg	acccgaaana	caatgaccaa	agatgctgag	720
agaggggaagc	tcaaacggag	agcaattgca	accccaggya	tgcacataag	ggggtttgta	780

tactttggtg	agacactggc	aaggagtata	tgtgagaaac	ttgaacaatc	agggttgcca	840
gttggaggca	atgagaagaa	agcaaagtig	gcaaatggtg	taaggaaget	gatgaccaat	900
tctcaggaca	cogaactttc	tttcaccatc	actggagata	acaccaaatg	gaacgaaaat	960
cagaatcctc	ggatggtttt	ggccatgata	acatataatg	ccagaaatca	gccccgaatg	1020
ttcagaaaatg	ttctaagtat	tgtctcaata	atggtctcaa	acaaaatggc	gagactggga	1080
aaagggatata	tgtttgagag	caagagtatg	aaacttagaa	ctcaaatacc	tgcagaaatg	1140
ctagccaggca	tcgatttgaa	atatttcaat	gattcaacaa	gaaagaaget	tgaaaaaatc	1200
cgaccgctct	taatagaggg	gactgcatac	ttgagccctg	gaatgatgat	gggcatgttc	1260
aatatggtta	gcactgtatt	aggcgtctcc	atcctgaatc	ttggacaaaa	gagatacacc	1320
aagactactt	actggtggga	tgytcttcaa	tctctgagc	attttgctct	gattgtgaat	1380
gcacccaatc	atgaagggat	tcaagccgga	gtcgacaggt	tttatcgaac	ctgtaaqcta	1440
cttggaaatca	atatagacae	gaaaaagtct	tacataaaca	gaacaggtac	atttgaattc	1500
acaagttttt	tctatcgtta	tgggtttggt	gccaatttca	gcatyggact	tcccagtttt	1560
ggggtgtctg	ggatcaacga	gtcagcggac	atgagtattg	gagttactgt	catcaaaaac	1620
aatatgataa	acaatgatct	tggctccagca	acagctcaaa	tggcccttca	gttgttcaatc	1680
aaagattaca	ggtacacgta	ccgatgccat	ataggtgaca	cacaaataca	aaccggaaga	1740
tcatttgaaa	taaagaaact	gtggagcaaa	acccttcca	aagctggact	gctggtctcc	1800
gacggaggcc	caaatttata	caacattaga	aatctccaca	ttctggaagt	ctgctaaaaa	1860
tgggaattga	tggatgagga	ttaccagggg	cgtttatgca	accactgaa	cccatttgtc	1920
agccataaag	aaattgaaatc	aatgaaccat	gcagtgatga	tgccagcaca	tggctcagcc	1980
aaaaacatgg	agtatgatgc	tgttgcaaca	acacactcct	ggatccccaa	agaaaatcga	2040
tccatcttga	atacaagtca	aagaggagta	cttgaggatg	aacaaatgta	ccaaaggtgc	2100
tgcaacttat	ttgaaaaatt	cttccccagc	agttcaatca	gaagaccagt	cgggatctcc	2160
agtatggtgg	aggctatggt	ttccagagcc	cgaattgatg	cacggattga	tttcgaatct	2220
ggaaggataa	agaaggaaga	gttcaactgag	atcatgaaga	tctgttccac	cattgaagag	2280
ctcagacggc	aaaaatagtg	aatttagctt	gtccttcaatg	aaaaaatgcc	ctgttctctac	2340
t						2341

ID SEC. Nº: 3

agcgaagca	ggtcaattat	attcaatatg	gaaagaataa	aagaactacg	aaatctaattg	60
tccagctctc	gcacccgcga	gatactcaca	aaaaccaccg	tggaccatat	ggccataatc	120
agaagtaca	catcaggaag	acaggagaag	aaccacgac	ttaggatgaa	atggatgatg	180
gcaatgaaat	atccaattac	agcagacaag	aggataacgg	aaatgattcc	tgagagaat	240
gagcaaggac	aaactttatg	gagtaaaaatg	aatgatgccg	gatcagaccg	agtgatggtta	300
tccctctgg	actgtgacatg	gtggaatagg	aatggaccaa	taacaaatac	agttcattat	360
ccaaaaatct	acaaaaactta	ttttgaaaga	gtcgaaaggc	taaagcatgg	aacctttggc	420
cctgtccatt	ttagaaacca	agtcaaaaata	cgctggagag	ttgacataaa	tcttggtcac	480
gcagatctca	gtgccaaagga	ggcacaggat	gtaatcatgg	aagttgtttt	ccctaacgaa	540
gtgggagcca	ggataactaac	atcggaatcg	caactaacga	taaccaaaaga	gaagaaagaa	600
gaactccagg	attgcaaaat	ttctcctttg	atggttgcat	acatggttga	gagagaactg	660
gtccgcaaaa	cgagattcct	cccagtggtc	ggtggaacaa	gcagtgtgta	cattgaagtg	720
ttgcatttga	ctcaaggaac	atgctgggaa	cagatgtata	ctccaggagg	ggaagtgagg	780
aatgatgatg	ttgatcaaag	cttgattatt	gctgctagga	acatagttag	aagagctgca	840
gtatcagcag	atccactagc	atctttattg	gagatgtgcc	acagcacaca	gattgggtgga	900
attaggatgg	tagacatcct	taggcagaac	ccaacagaag	agcaagccgt	ggatatatgc	960
aaggctgcaa	tgggactgag	aattagctca	tccttcagtt	ttggtggatt	cacatttaag	1020
agaacaagcg	gatcatcagt	caagagagag	gaagaggtgc	ttacgggcaa	tcttcaacaa	1080
ttgaagataa	gagtgcatga	gggatatgaa	gagttcacia	tggttgggag	aagagcaaca	1140
gccatactca	gaaaagcaac	caggagattg	attcagctga	tagtgagtgg	gagagacgaa	1200
cagtcgattg	ccgaagcaat	aattgtggcc	atggatattt	cacaagagga	ttgtatgata	1260
aaagcagtca	gagtgatct	gaatttcgtc	aatagggcga	atcaacgatt	gaatcctatg	1320
catcaacttt	taagacattt	tcagaaggat	gcgaaagtgc	tttttcaaaa	ttggggagtt	1380
gaacctatcg	acaatgtgat	gggaatgatt	gggatattgc	ccgacatgac	tccaagcatc	1440

ES 2 655 051 T3

gagatgtcaa	tgagaggagt	gagaatcagc	aaaatgggtg	tagatgagta	ctccagcagc	1500
gagagggtag	tgggtgagcat	tgaccgtttt	ttgagaatcc	gggaccaacg	aggaaatgta	1560
ctactgtctc	ccgaggaggt	cagtgaaaaca	cagggaacag	agaaactgac	aataacttac	1620
tcactcgtcaa	tgatgtggga	gattaatggt	cttgaalacg	tgttgggtcaa	tacctatcaa	1680
tggatcatca	gaaactggga	aactgttaaa	attcagtggt	cccagaaccc	tacaatgcta	1740
tacaataaaa	tggaaatttga	accatttcag	tcttttagtac	ctaaggccat	ttagggccaa	1800
tacagtgggt	ttglaaqaac	tctgttccaa	caaatgaggg	atgtgcttgg	gacatttgat	1860
accgcacaga	taataaaaact	tcttcccttc	gcagccgctc	caccaaagca	aagtagaatg	1920
cagttctctc	catttactgt	gaatgtgagg	ggatcaggaa	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctctctg	tattcaacta	taacaaggcc	acgaagagac	tcacagttct	cggaaaggat	2040
gctggcactt	taactgaaga	cccagatgaa	ggcacagctg	gagtggagtc	cgctgttctg	2100
aggggattcc	tcattctggg	caaagaagac	aagagatatg	ggccagcact	aagcatcaat	2160
gaactgagca	accttgcgaa	aggagagaag	gctaattgtc	taattgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtaa	tgaaacggaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaatcc	ggatggccat	caattagtgt	cgaatagttt	aaaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341

ID SEC. Nº: 4

agcaaaaagca	gggtagataa	tcactcactg	agtgacatca	aaatcatggc	gtctcaaggc	60
accaaaagat	cttacgaaca	gatggagact	gatggagaac	gccagaatgc	cactgaaatc	120
agagcatccg	tccgaaaaat	gattggtgga	attggacgat	totacatcca	aatgtgcacc	180
gaactcaaac	tcagtgatta	tgagggacgg	ttgatccaaa	acagertaac	aatagagaga	240
atggtgctct	ctgcttttga	cgaaaaggga	aataaatacc	ttgaagaaca	tcccagtgcg	300
gggaaaagtc	ctaagaaaac	tggaggacct	atatacagga	gagtaaacgg	aaagtggatg	360
agagaactca	tcctttatga	caaagaagaa	ataaggcgaa	tctggcgcca	agctaataat	420
ggtgacgatg	caacggcttg	tctgactcac	atgatgatct	ggcattccaa	tttgaatgat	480
gcaacttacc	agaggacaag	agctotttgt	cgcaccggaa	tggatcccag	gatgtgctct	540
ctgatgcaag	gttcaactct	ccctaggagg	tctggagccg	caggtgctgc	agtcaaagga	600
gttggaaaca	tggatgatga	attggtcaga	atgatcaaac	gtgggatcaa	tgatcggaac	660
ttctggaggg	gtgagaatgg	acgaaaaaca	agaattgctt	atgaaagaat	gtgcaacatt	720
ctcaaagggg	aatttcaaac	tgctgcacaa	aaagcaatga	tggatcaagt	gagagagagc	780
cggaaaccag	ggaatgctga	gttcgaagat	ctcacttttc	tagcacggtc	tgcactcata	840
ttgagagggg	cggttgctca	caagtctctc	ctgcttgctt	gtgtgtatgg	acctgcccga	900
gccagtgggt	acgactttga	aagggagggg	tactctctag	toggaataga	ccctttcaga	960
ctgcttcaaa	acagccaagt	gtacagccta	atcagaccaa	atgagaatcc	agcacacaag	1020
agtcaactgg	tgtggatggc	atgccattct	gccgcatttg	aagatctaag	agtattaaag	1080
ttcatcaaaq	ggacgaaagt	gctcccaga	gggaagcttt	ccactagagg	agttcaaat	1140
gcttccaatg	aaaatatgga	gactatggaa	tcaagtacac	ttgaactgag	aagcaggtac	1200
tgggccaata	ggaccagaag	tggaggaaac	accaatcaac	agagggcacc	tgcggggccaa	1260
atcagcatab	aacctacgtt	ctcaglacag	agaaatctcc	cttttgacag	aacaaccatt	1320
atggcagcat	tcaatgggaa	tacagagggg	agaacatctg	acatgaggac	cgaatcata	1380
aggatgatgg	aaagtgcaag	accagaagat	gtgtctttcc	aggggcgggg	agtcttcgag	1440
ctctcggacg	aaaaggcagc	gagcccgatc	gtgccttctt	ttgacatgag	taatgaagga	1500
tcttatttct	tccgagacaa	tgcagaggag	tccgacaatt	aaagaaaaat	acctttgttt	1560
ctact						1565

ID SEC. Nº: 5

agcaaaaagca	ggtagatatt	gaaagatgag	tcttctaacc	gaggtcgaaa	cgtacgtact	60
ctctatcacc	ccgtcaaggcc	ccctcaagcc	cgagatcgca	cagagacttg	aagatgtctt	120
tgcagggaaq	aacaccgatc	ttgaggttct	catggaatgg	ctaaagacaa	gaccaatcct	180
gtcacctctg	actaagggga	ttttaggatt	tgtgttcacg	ctcacccgtc	ccagtgagcg	240
aggactgcag	cgtagacgct	ttgtccaaaa	tgcccttaat	gggaaacggg	atccaaataa	300
catggacaaa	gcagttaaac	tgtataggaa	gctcaagagg	gagataacat	tccatggggc	360
caaagaaatc	tcactcagtt	attctgctgg	tgcacttgcc	agttgtatgg	gcctcatata	420
caacaggatg	ggggctgtga	ccactgaagt	ggcatttggc	ctggtatgtg	caacctgtga	480

ES 2 655 051 T3

acagattgct	gactcccage	atcgggtctca	taggcaaatg	gtgacaacaa	ccaatccact	540
aatcagacat	gagaacagaa	tqgttttagc	cagcactaca	gctaaggcta	tggagcaaat	600
ggctggatcg	agtgagcaag	cagcagaggg	catggagggt	gctagtcagg	ctagacaaat	660
ggtgcaagcg	atgagaacca	ttgggactca	tcctagctcc	agtgcctggc	tgaaaaatga	720
tcttcttgaa	aatttgcagg	cctatcagaa	acgaatgggg	gtgcagatgc	aacgggtcaa	780
gtgatacctc	cactattgcc	gcaaatatca	ttgggatctt	gcacttgaca	ttgtggattc	840
ttgatcgtct	ttttttcaaa	tgcatttacc	gtcgttttaa	ataccggactg	aaaggagggc	900
cttctacgga	aggagtgcga	aagtctatga	gggaagaata	tcgaaaggaa	cagcagagtg	960
ctgtggatgc	tgacgatggt	cattttgtca	gcatagagct	ggagtaaaaa	actaccttgt	1020
ttctact						1027

ID SEC. Nº: 6

agcaaaaagca	gggtgacaaa	aacataatgg	atccaaacac	tgtgtcaagg	tttcaggtag	60
attgctttct	ttggcatgtc	cgcaaacgag	ttgcagacca	agaactaggc	gatgccccat	120
tccttgatcg	gcttcgcccga	gatcagaast	ccctaagagg	aaggggcagt	actctgggtc	180
tggacatcaa	gacagcccga	cgtgctggaa	agcagatagt	ggagcggatt	ctgaaagaag	240
aatccgatga	ggcacttaa	atgcccattg	cctctgtacc	tgcgtcgcgt	tacctaaactg	300
actgaactct	tgaaggaaatg	tcgaaggact	ggctccatgct	catacccag	cagaaagtgg	360
caggccctct	ttgtatcaga	atggaccagg	cgatcatgga	taagsacata	atactgaaaag	420
cgaacttcag	tgtgattttt	gaccggctgg	agactctaat	attgctaagg	gctttcaccg	480
aagagggagc	aattgthtgg	gaaatttcac	cattgcoctc	totlecagga	catactgctg	540
aggatgtcaa	aaatgcagtt	ggagtcttca	tgggaggact	tgaatggaat	gataaacacag	600
ttcgagtctc	tgaaaactct	cagagattcg	cttggagaag	cagtaatgag	aatgggagac	660
ctccactcac	tccaaaaacag	aaacgagaaa	tggcgggaac	aattaggtca	gaagtttgaa	720
gaaataagat	ggttgattga	agaagtgaga	cacaaactga	agataacaga	gaatagtttt	780
gagcaasata	catlilatgca	agccttacat	ctattgcttg	aagtggagca	agagataaga	840
actttctcgt	ttcagcttat	ttagtactaa	aaaaccctct	tgtttctact		890

ID SEC. Nº: 7

agcaaaaagca	ggggaaaaata	aaaacaacca	aatgaagggc	aaacctactg	gtcctgttat	60
gtgcacttgc	agctgcagat	gcagacacaa	tatgtatagg	ctaccatgcg	aacaattcaa	120
ccgacactgt	tgacacagta	ctcgagaaga	atgtgacagt	gacacactct	gttaacctgc	180
tcgaagacag	ccacaacgga	aaactatgta	gattaaaagg	aatagcccc	ctacaattgg	240
ggaaatgtaa	catcgccgga	tggctcttgg	gaaaccagga	atcgaccca	ctgcttccag	300
trgatcatg	gtcctacatt	gtagaaaac	caaactctga	gaatggaata	tgttatccag	360
gagatttcat	cgactatgag	gagctgaggg	agcaattgag	ctcagtgtca	tcattcgaaa	420
gattcgaaat	atttcccaaa	gaaagctcat	ggcccaacce	caacacaaac	ggagtaacgg	480
cagcatgctc	ccatgagggg	aaaagcagtt	tttacagaa	tttgcctatgg	ctgacggaga	540
aggagggctc	atacccaaaag	ctgaaaaatt	cttatgtgaa	caaaaaaggg	aaagaagtcc	600
ttgtactgtg	gggtattcat	caccgccta	acagtaagga	acaacagaat	ctctatcaga	660
atgaaaatgc	ttatgtctct	gtagtgaact	caaattataa	caggagattt	accccgga	720
tagcagaaaag	acccaaagta	agagatcaag	ctgggaggat	gaactattac	tggaccttgc	780
taaaaccggg	agacacaata	atatttgagg	caaatggaaa	totaatagca	ccaatgtatg	840
ctttcgcact	gagtagaggg	tttgggtccg	gcatacacc	ctcaaacgca	tcaatgactg	900
agtgtaacac	gaagtgtcaa	acaccctcgg	gagctataaa	cagcagctctc	ccttaccaga	960
atatacaccc	agtcaacaata	ggagagtgcc	caaaatcagt	caggagtgcc	aaattgagga	1020
tggttacagg	actaagggaac	attcogtcca	ttcaatccag	aggtctatct	ggagccattg	1080
ccggttttat	tgaaggggga	tggactggaa	tgatagatgg	atggatgggt	tatcatcctc	1140
agatgaaca	ggagtccggc	tatgcagcgg	atcaaaaaag	cacacaaaat	gccattaacg	1200
ggattacaaa	caagggtgaac	actgttatcg	agaaaatgaa	cattcaattc	acagctgtgg	1260
gtaaagaatt	caacaaatta	gaaaaaagga	tggaaaattt	aaataaaaaa	gttgatgatg	1320
gatttctgga	catttggaca	tataatgcag	aattgttagt	tctactggaa	aatgaaaagga	1380
ctctggattt	ccatgactca	aatgtgaaga	atctgtatga	gaaagtaaaa	agccaattaa	1440

ES 2 655 051 T3

agaataatgc	caaagaatc	ggaatggat	gttttgagtt	ctaccacaag	tgtgacaatg	1500
aatgcatgga	aagtgtaga	aatgggaact	atgattatcc	caaataatca	gaagagtcaa	1560
agttgaacag	ggaaaaggta	gatggagtga	aattggaatc	aatggggatc	tatcagatcc	1620
tgggateta	ctcaactgbc	gccagttcac	tgggtctttt	ggctcctctg	ggggcaatca	1680
gtttctggat	gtgttcta	ggatctttgc	agtgcagaat	atgcatctga	gattagaatt	1740
tcagagatat	gaggaaaaac	acccttgttt	ctact			1775

ID SEC. Nº: 8

agcaaaagca	ggggtttaaa	atgaatccaa	atcagaaaat	aataaccatt	ggatcaatct	60
gtctggtagt	cggaactaatt	agcctaata	tgcaaatagg	gaatataatc	tcaatatgga	120
ttagccattc	aattcaaaact	ggaagtcaaa	accatactgg	aatatgcaac	caaaacatca	180
ttacctataa	aaatagcacc	tgggtaaagg	acacaacttc	agtgatatta	accggcaatt	240
catctctttg	tcccactcgt	gggtgggcta	tatacagcaa	agacaatagc	ataagaattg	300
gttccaaagg	agacgttttt	gtcataagag	agccctttat	ttcatgttct	cacttgggaat	360
gcaggacott	ttttctgacc	caaggtgctt	tactgaatga	caagcattca	agtgggactg	420
ttaaggacag	aagcccttat	agggccttaa	tgagctgccc	tgtcggtgaa	gctccgtccc	480
cgtacaattc	aagatttgaa	tcggttgctt	ggtcagcaag	tgcattgcat	gatggcatgg	540
gctggctaac	aatcgggaatt	tcaggtccag	ataatggagc	agtggctgta	ttaaaataca	600
acggcataat	aactgaaacc	ataaaaagtt	ggaggaagaa	aatattgagg	acacaagagt	660
ctgaatgtgc	ctgtgtaaat	ggttcatggt	ttactataat	gactgatggc	ccgagtgatg	720
ggctggcctc	gtacaaaatt	ttcaagatcg	aaaaggggaa	ggttactaaa	tcaatagagt	780
tgaatgcacc	taattctcac	tatgaggaat	gttctctgta	ccctgatacc	ggcaaaagtga	840
tgtgtgtgtg	cagagacaat	tggcatgggt	cgaaccggcc	atgggtgctt	ttcgatcaa	900
acctggatta	tcaaatagga	tacatctgca	gtggggtttt	cggtgacaac	ccgcgtcccg	960
aagatggaac	aggcagctgt	ggtccagttg	atgltgatgg	agcaaacgga	gtaaagggat	1020
tttcatatag	gtatggtaat	ggtgtttgga	taggaaggac	caaaagtcac	agttccagac	1080
atgggtttga	gatgatttgg	gatcctaatt	gatggacaga	gactgatagt	aagttctctg	1140
tgaggcaaga	tgttgtggca	atgactgatt	ggtcagggta	tagcgggaagt	ttcgttcaac	1200
atcctgagct	gacagggcta	gactgtatga	ggccgtgctt	ctgggttgaa	ttaatcaggg	1260
gacgacctaa	agaaaaaaca	atctggacta	gtgcgagcag	catttctttt	tgtggcgtga	1320
atagtgatac	tgtagattgg	tcttggccag	acgggtgctga	gttgccattc	agcattgaca	1380
agtagtctgt	tcaaaaaaact	ccttgtttct	act			1413

ID SEC. Nº: 10

agcgaaagca	ggtcaattat	attcaatctg	gaaagaataa	aagaactaag	aaatctaattg	60
tgcagctctc	gcacccgcga	gatactcaca	aaaaccaccg	tggaccatat	ggccataatc	120
aagaagtaca	catcaggaag	acaggagaag	aaccagcac	ttaggatgaa	atggatgatg	180
gcaatgaaat	atccaattac	agcagacaag	aggataaccg	aatgattcc	tgagagaaat	240
gagcaaggac	aaactttatg	gagtaaatg	aatgatgccg	gatcagaccg	agtgatggta	300
tcacctctgg	ctgtgacatg	gtggaatagg	aatggaccac	tgacaatac	agttcattat	360
ccaaaaatct	acaaaactta	ttttgaaaga	gtcgaaggcc	taaagcatgg	aacctttggc	420
ccgtctcatt	ttagaaacca	agtcaaaata	cgtcggagag	ttgacataaa	tcctggctcat	480
gcagatctca	gtgccaagga	ggcacaggat	glaatcatgg	aagttgtttt	ccctaaccgaa	540
gtgggagcca	ggatactaac	atcggaatcg	caactaacga	taaccaaaaga	gaagaaagaa	600
gaactccagg	attgcaaaat	ttctcctttg	atggttgcat	acatgttggg	gagagaactg	660
gtccgcacaaa	cgagattcct	cccagtgctt	ggtggaacaa	gcagtctgta	cattgaagtg	720
ttgcatttga	ctcaaggaaac	atgctgggaa	cagatgtata	ctccaggagg	ggaagtgaag	780
aatgatgatg	ttgatcaaaag	cttgattatt	gctgctagga	acatagtggg	aagagctgca	840
gtatcagcag	accactagc	atctttattg	gagatgtgcc	acagcacaca	gattgggtgga	900
attaggatgg	tagacatcct	taagcagaac	ccaacagaag	agcaagccgt	ggatatatgc	960
aaggctgcaa	tgggactgag	aattagctca	tccttcagtt	ttggtggatt	cacatttaag	1020
agaacaagcg	gatcatcagt	caagagagag	gaagaggtgc	ttacgggcaa	tcttcaaaaca	1080
ttgaagataa	gagtgcattg	gggatctgaa	gagttcaca	tgggtgggag	aagagcaaca	1140
gcatactca	gaaaaagcaac	caggagattg	atcagctga	tagtgagtgg	gagagacgaa	1200

cagtcgattg	ccgaageaat	aattgtggcc	atggtatfff	cacaagagga	ttgtatgata	1260
aaagcagtta	gaggtgatct	gaatttcgtc	aatagggcga	atcagcgact	gaatcctatg	1320
catcaacttt	taagacattt	tcagaaggat	gcgaaagtgc	tttttcaaaa	ttggggagtt	1380
gaacctatcg	acaatgtgat	gggaatgatt	gggatattgc	ccgacatgac	tccaagcatc	1440
gagatgtcaa	tgagaggagt	gagaatcagc	aaaatgggtg	tagatgagta	ctccagcaag	1500
gagayggtag	tggtgagcat	tgaccgggtc	ttgagagtca	gggaccaacg	aggaatgta	1560
ctactgtctc	ccgaggaggt	cagtgaaca	cagggaacag	agaaactgac	aataacttac	1620
tcctcgtcaa	tgatgtggga	gattaatggt	cctgaatcag	tgttggtcaa	tacctatcaa	1680
tggtatcatca	gaaactggga	aactgttaaa	atcagtggt	cccagaacct	tacaatgcta	1740
tacaataaaa	tggaaattga	accatttcag	tctttagtac	ctaaggccat	tagaggccaa	1800
tacagtgggt	ttgtaagaac	tctgttccaa	caaatgaggg	atgtgcttgg	gacatttgat	1860
accgcacaga	taataaaaact	tcttcccttc	gcagccgctc	caccaaagca	aagtagaatg	1920
cagttctcct	catttactgt	gaatgtgagg	ggatcaggaa	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctctctg	tattcaacta	caacaaggcc	acgaagagac	tcacagttct	cggaaggat	2040
gctggcaact	taaccgaaga	cccagatgaa	ggcacagctg	gagtggagtc	cgctgttctg	2100
aggggattcc	tcattctggg	caaagaagac	aggagatag	ggccagcatt	aagcatcaat	2160
gaactgagca	accttgcgaa	aggagagaag	gctaattgtc	taattgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtaa	tgaaacgaaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaatte	ggatggccat	caattagtgt	cgaatagttt	aaaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341

ID SEC. Nº: 11

agcgaaaagca	ggcaaaacct	ttgaatggat	gtcaatccga	ccttactttt	cttaaaagtg	60
ccagcacaaa	atgctataag	cacaactttc	ccttataccg	gagaccctcc	ttacagccat	120
gggacaggaa	caggatacac	catggatact	gtcaacagga	cacatcagta	ctcagaaaag	180
ggaagatgga	caacaacac	cgaaactgga	gcaccgcaac	tcaaccgat	tgatgggcca	240
ctgccagaag	acaatgaacc	aagtggttat	gccccaacag	attgtgtatt	ggaagcaatg	300
gctttccttg	aggaatccca	tcttggattt	tttgaaaact	cgtgtattga	aacgatggag	360
gttgttcagc	aaacacgagt	agacaagctg	acacaaggcc	gacagaccta	tgactggact	420
ttaaatagaa	accagcctgc	tgcaacagca	ttggccaaca	caatagaagt	gttcagatca	480
aatggcctca	cggccaatga	gtcaggaagg	ctcatagact	tccttaagga	tgtaatggag	540
tcaatgaaaa	aagaagaaat	ggggatcaca	actcattttc	agagaaagag	acgggtgaga	600
gacaatatga	ctaagaaaaat	gataacacag	agaacaatag	gtaaaaggaa	acagagattg	660
aaacaaaggg	gttatctaat	tagagcattg	accctgaaca	caatgacca	agatgctgag	720
agagggagc	taaaaaggag	agcaattgca	accccaggga	tgcaataaag	ggggtttgta	780
tactttgttg	agacactggc	aaggaglata	tgtgagaaac	ttgaacaate	agggttgoca	840
gttggagggc	atgagaagaa	agcaagtttg	gcaaatgttg	taaggaaagt	gatgaccaat	900
tctcaggaca	ccgaactttc	tttcaaccate	actggagata	acaccaaatg	gaacgaaat	960
cagaatcctc	ggatgttttt	ggccatgatc	acataatga	ccagaaatca	gcccgaatgg	1020
ttcagaaatg	ttctaagtat	tgtccaata	atgttctcaa	acaaaatggc	gagactggga	1080
aaaggtata	tgtttgagag	caagagtatg	aaacttagaa	ctcaaatacc	tgcaaaaatg	1140
ctagcaagca	ttgatttgaa	atatttcaat	gattcaacaa	gaaagaagat	tgaaaaaatc	1200
cgaccgctct	taatagaggg	gactgcacca	ttgagccctg	gaatgatgat	gggcatgttc	1260
aatatgttaa	gcactgtatt	aggcgtctcc	atcctgaatc	ttggacaaaa	gagatacacc	1320
aagactactt	actgggtggga	tggtcttcaa	tcctctgacg	atthtgotct	gattgtgaa	1380
gcacccaatc	atgaagggat	tcaagccgga	gtcagacaggt	tttatcgaac	ctgtaagcta	1440
cttggaaatca	atatgagcaa	gaaaaagtct	tacataaaca	gaacaggtac	atthgaaatc	1500
acaagttttt	tcctatcgta	tgggtttgtt	gccaattttca	gcattggagct	tcccagtttt	1560
ggggtgtctg	ggatcaacga	gtcagcggac	atgagtattg	gagttactgt	catcaaaaac	1620
aatatgataa	acaatgatct	tggtccagca	acagctcaaa	tgcccttca	gttqttcacc	1680
aaagattaca	ggtaacagta	ccgatgccat	agaggtgaca	cacaaataca	aaccggaaga	1740
tcatttgaaa	taaagaaact	gtgggagcaa	acccgttcca	aagetggact	gctggtctcc	1800
gacggaggcc	caattttata	caacattaga	aatctccaca	ttcctgaagt	ctgocataaa	1860
tggaatttga	tggatgagga	ttaccagggg	cgtttatgca	acccactgaa	cccatttgtc	1920

ES 2 655 051 T3

agccataaag	aaattgaatc	aatgaacaat	gcagtgatga	tgccagcaca	tggtccagcc	1980
aaaaacatgg	agtatgatgc	tgttgcaaca	acacactcct	ggatccccaa	aagaaatcga	2040
tccatcttga	atacaagtca	aagaggagta	ottgaagatg	aacaaatgta	ccaaaggtgc	2100
tgcaatztat	ttgaaaaatt	cttccccagc	agttcataca	gaagaccagt	cgggatatcc	2160
agtatggtgg	aggctatggt	ttccagagcc	cgaaltgatg	cacggattga	tttccaatct	2220
ggaaggataa	agaaagaaga	gttcactgag	atcatgaaga	tctgttcac	cattgaagag	2280
ctcagacggc	aaaaatagtg	aatttagctt	gtccttcctg	aaaaaatgcc	ttgtttctac	2340
t						2341

ID SEC. Nº: 12

agcgaaagca	ggtactgatt	caaaatggaa	gattttgtgc	gacaatgctt	caatccgatg	60
attgtccagc	ttgcggaaaa	aacctgaaa	gagtatgggg	aggacctgaa	aatccgaaaca	120
aaacaatttg	caqcaatatg	cactcacttg	gaagtatgct	tcattgtatc	agatttccac	180
ttcatcaatg	agcaaggcga	gtcaataatc	gtagaacttg	gtgatccata	tgcaactttg	240
aagccacgat	ttgaaataat	cgagggaaga	galccgcaca	tggcctggac	agtatgaaac	300
agtatttgca	acactacagg	ggctgagaaa	ccaaagtttc	taccagattt	gtatgattac	360
aaggaaaata	gattcatcga	aattggagta	acaaggagag	aagttcacat	atactatctg	420
gaaaaggcca	ataaaattaa	atctgagaaa	acacacatcc	acattttctc	gttcaactgg	480
gaagaaatgg	ccacaagggc	cgactacact	ctcgatgag	aaagccgggc	taggatcaaa	540
accaggetat	tcaccataag	acaagaaatg	gocagcagag	gootctggga	ttcctttcgt	600
cagtcocgga	gaggagaaga	gacaaltgaa	gaaaggtttg	aaatcacagg	aacaatgcgc	660
aagcttgccg	accaaagctc	ccgcgccaac	ttctccagcc	ttgaaaaatt	tagagcctat	720
gtggatggat	tcgaaccgaa	cggtacatt	gagggcaagc	tgtctcaaat	gtccaaagaa	780
gtaaatgcta	gaaltgaacc	ttttttgaaa	acaacaccac	gaccacttag	acttccgaat	840
gggootccct	gttctcagcg	gtccaaatc	ctgctgatgg	atgccttaa	atlaagcatt	900
gaggaccocaa	gtcatgaagg	agagggaaata	cogctaatg	atgcaatcaa	atgcatgaga	960
acattctttg	gatggaagg	acccaatggt	gttaaacacc	acgaaagggg	aataaatcca	1020
aattatcttc	tgtcatggaa	gcaagtactg	gcagaactgc	aggacattga	gaatgaggag	1080
aaaattccaa	agcataaaaa	tatgaaaaaa	acaagtccgc	taaagtgggc	acttgggtgag	1140
aacatggcac	cagaaaagg	agactttgac	gactgtaaag	atgtaggtga	tttgaagcaa	1200
tatgatagtg	atgaaccaga	attgaggtcg	cttgcaagtt	ggattcagaa	tgagttcaac	1260
aaggcatgog	aactgacage	ttcaagctgg	atagagcttg	atgagattgg	agaagatgtg	1320
gctccaatcg	aacacattgc	aagcatgaga	aggaattatt	tcacatcaga	ggtgtctcac	1380
tgcaagacca	cagaatacat	aatgaagggg	gtgtacatca	etactgcott	acttaatgca	1440
tcttgtgcag	caatggatga	tttccaatta	attccaatga	taagcaagtg	tagaactaag	1500
gagggaaagg	gaaaagacc	cttgtatggt	ttcatcataa	aaggaagatc	ccacttaagg	1560
aatgacacog	acgtggtaaa	cttgtgtgag	atggagtttt	ctctcactga	ccccagactt	1620
gaaccacaca	aatgggagaa	gtactgtgtt	cttgagatag	gagatattgt	totaagaagt	1680
gccataggcc	aggtttcaag	gcccattgga	ttgtatgtga	ggacaaatgg	aacctcaaaa	1740
attaaaaatga	aatggggaa	ggagatgagg	cgttgtctcc	tccagtcact	tcacaaaatt	1800
gagagtatga	ttgaaagctga	gtcctctgtc	aaagagaaag	acatgaccaa	agagttcttt	1860
gagaacaaat	cagaaacatg	gcccaltgga	gagtctccca	aaggagtgg	ggaaaqttcc	1920
attgggaagg	tctgcaggac	tttattagca	aagtccgtat	ttaccagctt	gtatgcactc	1980
ccacaactag	aaggattttc	agctgaatca	agaaaactgc	ttcttatcgt	tcaggctctt	2040
agggacaate	tggaaacctgg	gacctttgat	cttggggggc	tatatgaagc	aattgaggag	2100
tgccataatta	atgatccctg	ggttttgctt	aatgcttctt	ggttcaactc	cttctctaca	2160
catgcattga	gttagttgtg	gcagtgctac	tatttgcctat	ccatactgtc	caaaaaagtta	2220
cuttgtttct	act					2233

ID SEC. Nº: 13

agcaaaagca	gggtagataa	tcactcactg	agtgcacatca	aaatcatggc	gtcccaaggc	60
accaaaagggt	cttacgaaca	gatggagact	gatggagaaac	gccagaatgc	cactgaaatc	120
agagcatccg	toggaaaaat	gattggtgga	attggacgat	tctacatcca	aatgtgcaca	180

ES 2 655 051 T3

gaacttaaac	tcagtgatta	tgaggggacgg	ttgatccaaa	acagcttaac	aatagagaga	240
atgggtgctct	ctgcttttga	cgaaaggaga	aataaatacc	tggagaaca	tcccagtgcg	300
gggaaagatc	ctaagaaaac	tggaggacct	atatacagaa	gagtaaacgg	aaagtggatg	360
agagaactca	tcccttatga	caaagaagaa	ataaggcgaa	tctggcgcca	agctaataat	420
ggtgacgatg	caacggctgg	tctgactcac	atgatgatct	ggcaatccaa	tttgaatgat	480
gcaacttatc	agaggaceag	ggctcttgtt	cgcaaccggaa	tggatcccag	gatgtgctct	540
ctgatgcaag	gttcaactct	ccctaggagg	tctggagccg	caggtgctgc	agtcaaagga	600
gttggaacaa	tggtgatgga	attggtcagg	atgatcaaac	gtgggatcaa	tgatcggaac	660
ttctggaggg	gtgagaatgg	acgaaaaaca	agaattgctt	atgaaagaat	gtgcaacatt	720
ctcaaagggg	aatttcaaac	tgctgcacaa	aaagcaatga	tggatcaagt	gagagagagc	780
cggaaaccag	ggaatgctga	gttcgaagat	ctcaactttc	tggcaggtc	tgcactcata	840
ttgagagggg	cggttgctca	caagtctgc	ctgctctag	gtgtgtatgg	acctccgta	900
gocagtggtt	acgacttga	aagagagggg	tactctctag	tgggaataga	cccttccaga	960
ctgcttcaaa	acagccaagt	gtacagccta	atcagaccaa	atgagaatcc	agcacacaag	1020
agtcaactgg	tgtgatggc	atgccattct	gcogatttg	aagatctaag	agtattgagc	1080
ttcatcaaa	ggacgaaggt	ggtcccaaga	gggaagcttt	ccactagagg	agttcaaat	1140
gottocaatg	aaaatagga	gactatggaa	tcaagtacac	ttgaactgag	aagcaggtac	1200
tgggccataa	ggaccagaag	tggaggaaac	accaatcaac	agagggcatc	tgcgggccaa	1260
atcagcatac	aacctacgtt	ctcagtacag	agaaatctcc	cttttgacag	aacaaccggt	1320
atggcagcat	tcactgggaa	tacagagggg	agaacatctg	acatgaggac	cgaaatcata	1380
aggatgatgg	aaagtqcaag	accagaagat	gtgtctttcc	aggggggggg	agtcttogag	1440
ctctcggacg	aaaaggcagc	gagcccgatc	gtgccttctt	ttgacatgag	taatgaagga	1500
tcttatttct	tgggagacaa	tgcagaggag	tacgacaatt	aaagaaaaat	acctttgttt	1560
ctact						1565

ID SEC. Nº: 14

agcaaaaagca	ggtagatatt	gaaagatgag	tcttctaacc	gaggtcgaaa	cgtacqttct	60
ctctatcacc	ccgtcagggc	ccctcaaaagc	cgagatcgca	cagagacttg	aagatgtctt	120
tgcaggggaag	aacaccgatc	ttgaggttct	catggaatgg	ctaaagacaa	gaccaatcct	180
gtcaactctg	actaaggggg	tttaggatt	tgtgttcacg	ctcaaccgtc	ccagtgageg	240
aggatgacag	cgtagacgct	ttgtccaaaa	tgcccttaat	gggaacgggg	atccaaataa	300
catggacaaa	gcagttaaac	tgtataggaa	gctcaagagg	gagataacat	tccatggggc	360
caaagaaatc	tcactcagtt	attctgctgg	tgcacttggc	agttglatgg	gcctcatata	420
caacaggatg	ggggctgtga	ccactgaagt	ggcatttggc	ctggtatgtg	caacctgtga	480
acagattgct	gactcccagc	atcggctctca	taggcaaatg	gtgacaacaa	ccaaccact	540
aatcagacat	gagaacagaa	tggtttttagc	cagcactaca	gctaaggcta	tggagcaaat	600
ggctggatcg	agtgaqcaag	cagcagaggc	catggaggtt	gctagtcagg	ctaggcaaat	660
ggtgcaagcg	atgagaacca	ttgggactca	tcttagctcc	agtgctggtc	tgaaaaatga	720
tcttcttgaa	aatttgcagg	ccatcagaa	acgaatgggg	gtgcagatgc	aacggttcaa	780
gtgatectct	cgctattgcc	gcaaatatca	ttgggatctt	gcacttgata	ttgtggatc	840
ttgatcgtct	ttttttcaaa	tgcatttaac	gtcgttttaa	atacggactg	aaaggagggc	900
cttctacggg	aggagtgcc	aagtcctatga	gggaagaata	tcgaaaggaa	cagcagagtg	960
ctgtggatgc	tgacgatggt	cattttgtca	gcatagagct	ggagtaaaaa	actacctgtt	1020
ttctact						1027

ID SEC. Nº: 15

agcaaaaagca	gggtgacaaa	gacataatgg	atccaaacac	tgtgtcaagc	tttcaggtag	60
attgctttct	ttggcatgtc	cgcaaacgag	ttgcagacca	agaactaggt	gatgccccat	120
tccctgatcg	gottcgcoga	gatcagaaat	ccctaagagg	aaggggcagc	actcttggtc	180
tggacatcga	gacagccaca	cgtgctggaa	agcagatagt	ggagcggatt	ctgaaagaag	240
aatccgatga	ggcacttcaa	atgaccatgg	ccctctgtacc	tgcgtcgcgt	tacctaacccg	300
acatgactct	tgaggaaatg	tcaagggaat	ggtccatgct	catacccaag	cagaaagtgg	360
caggccctct	ttgtatcaga	atggaccagg	cgatcatgga	taaaaacatc	atactgaaag	420
cgaacttcag	tgtgattttt	gaccggctgg	agactctaat	attgctaagg	gctttcaccg	480
aagagggagc	aattgttggc	gaaatttcaac	cattgccttc	tcttccagga	catactgctg	540

ES 2 655 051 T3

aggatgtcaa	aatgcagtt	ggagtctca	tggaggact	tgaatggaat	gataacacag	600
ttcgagtctc	tgaactcta	cagagattcg	cttggagaag	cagtaatgag	aatgggagac	660
ctccactcac	tccaaaacag	aaacgagaaa	tggcgggaac	aattaggtca	gaagtttgaa	720
gaaataagat	ggttgattga	agaagtgaga	cacaaactga	aggtaacaga	geatagtttt	780
gagcaataaa	catttatgca	agccttacct	ctattgcttg	aagtggagca	agagataaga	840
actttctcat	ttcagcttat	ttaataataa	aaaacacct	tgttctact		890

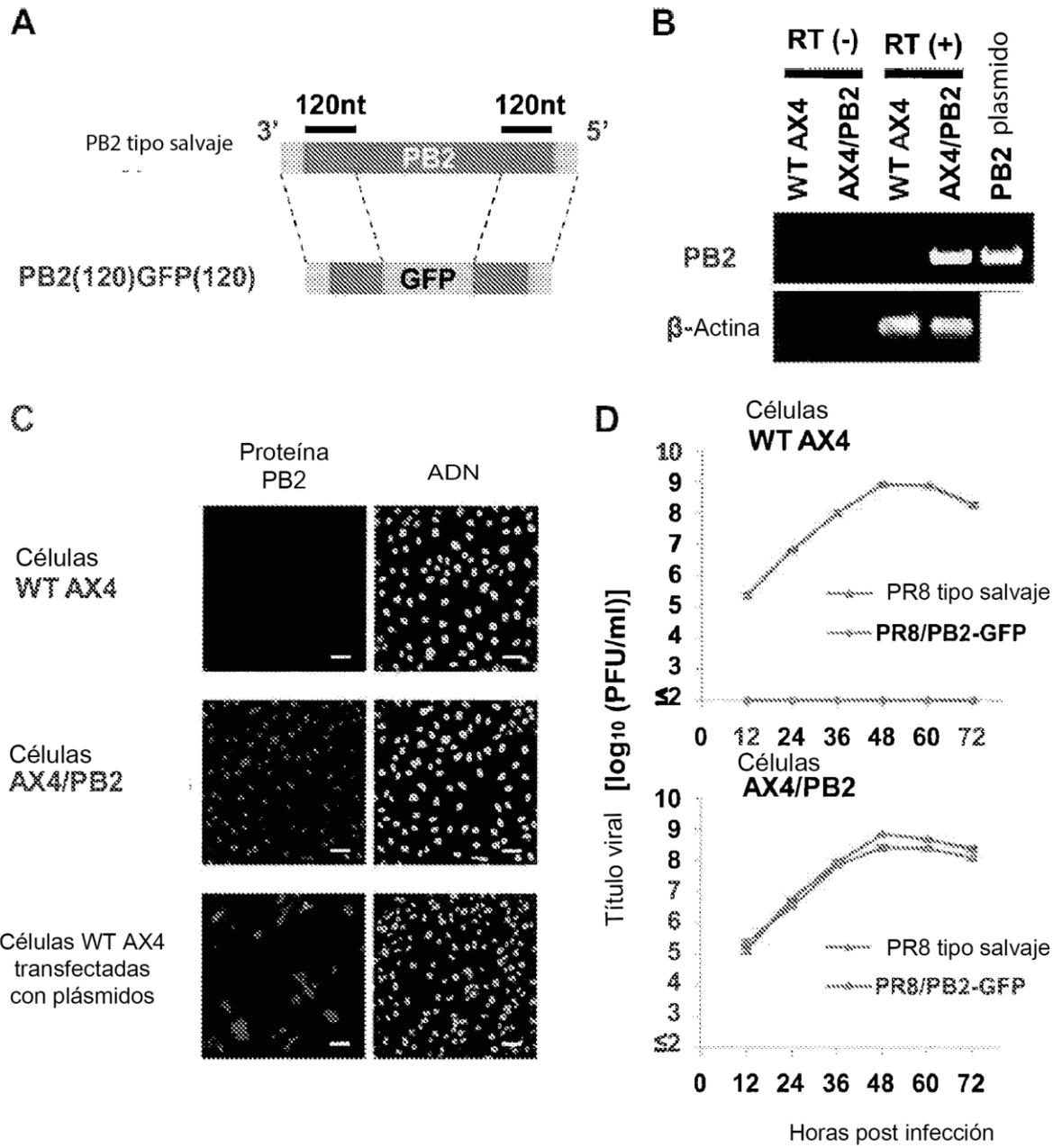


FIG. 3

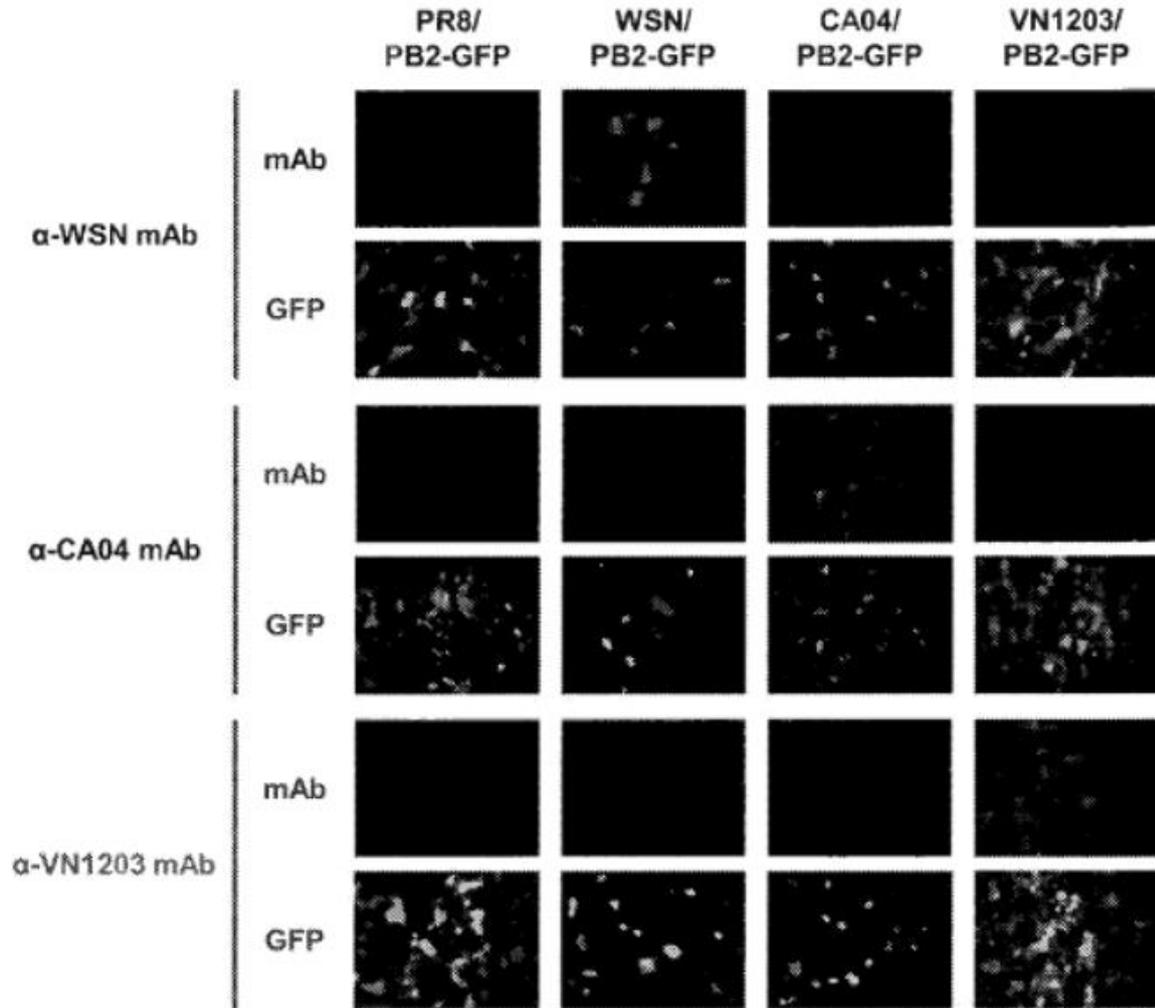


FIG. 4

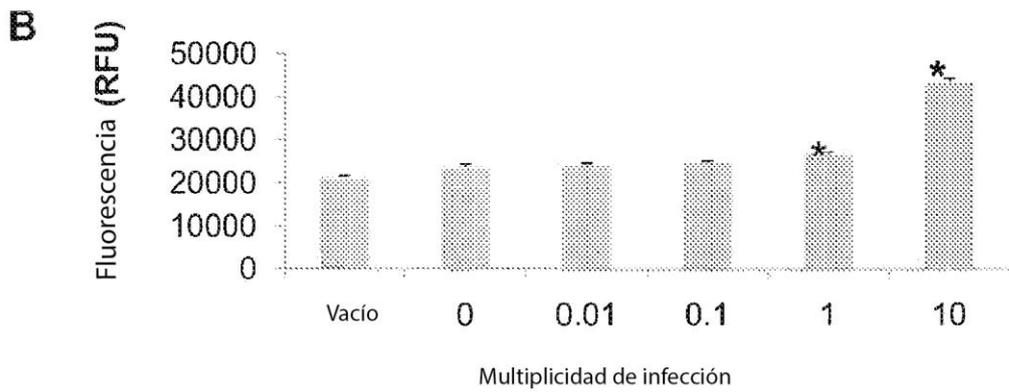
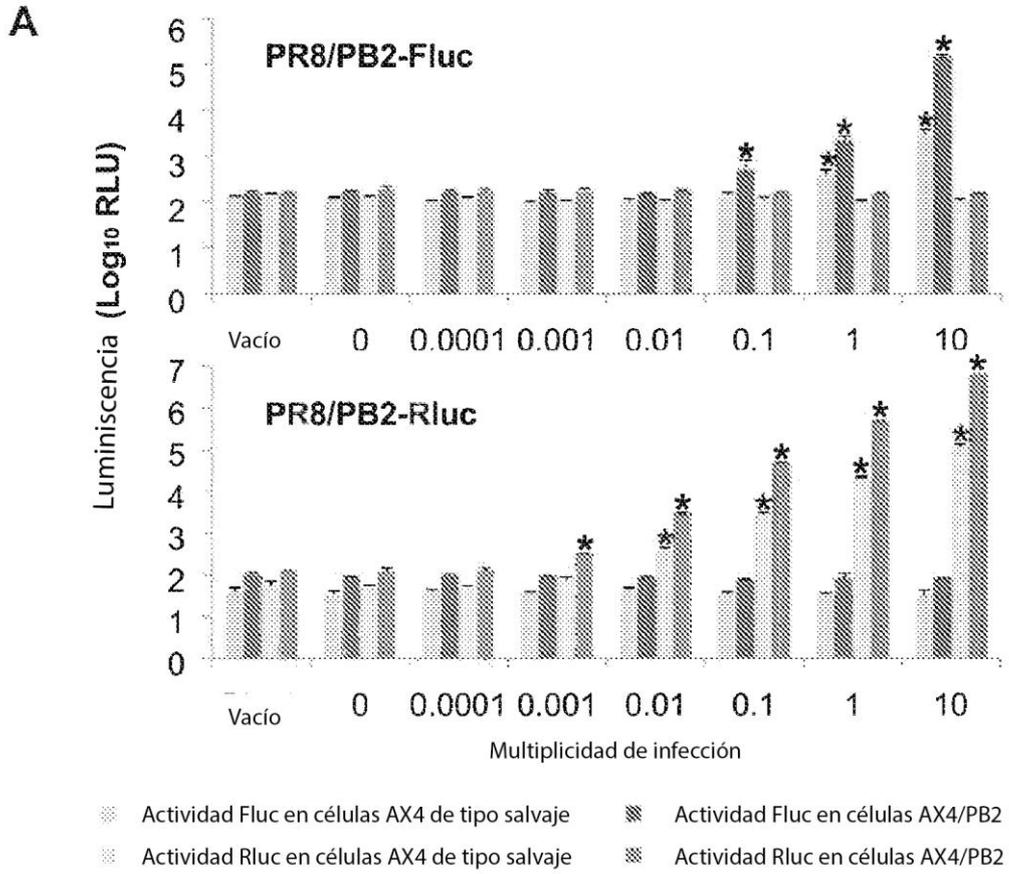


FIG. 5

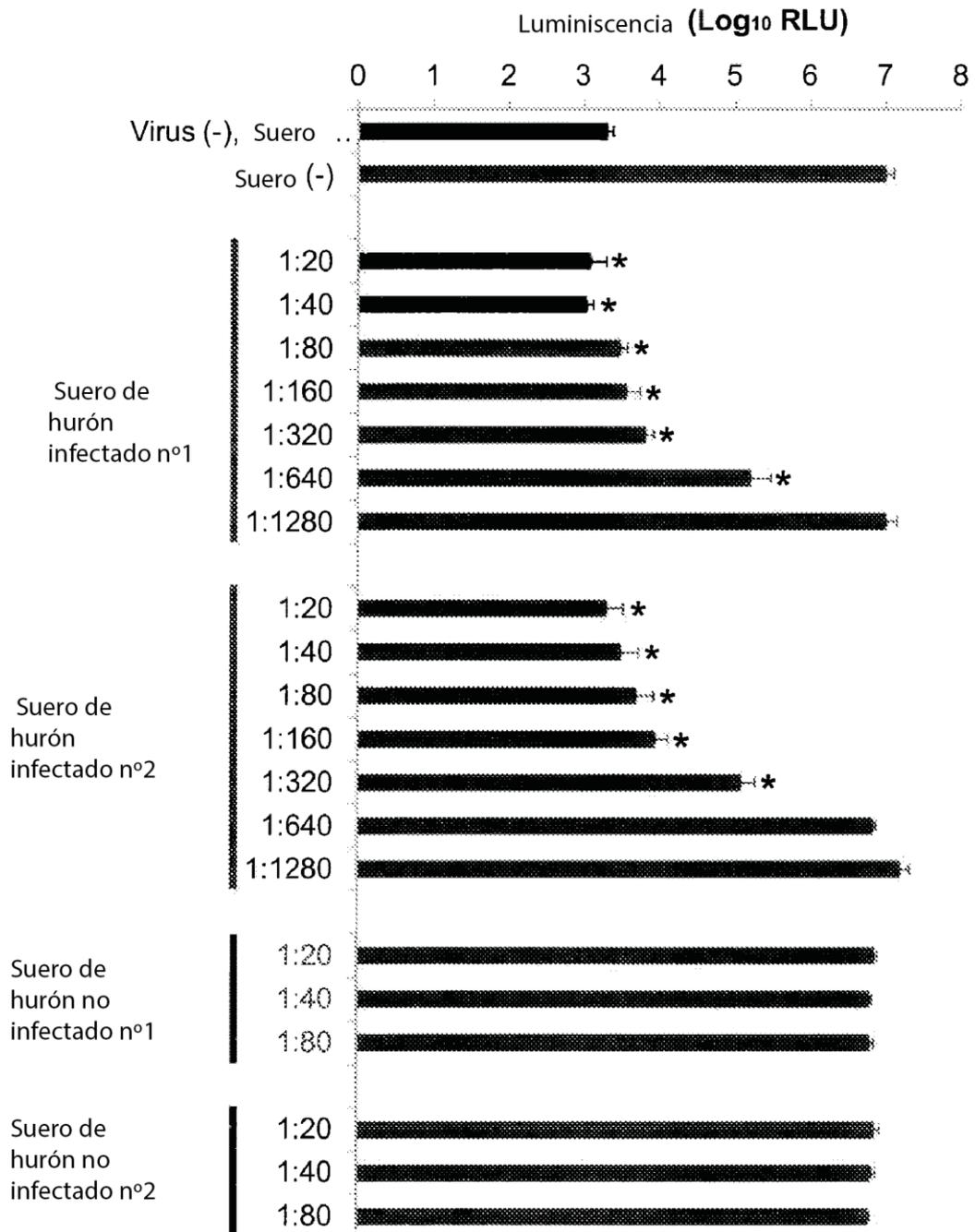


FIG. 6

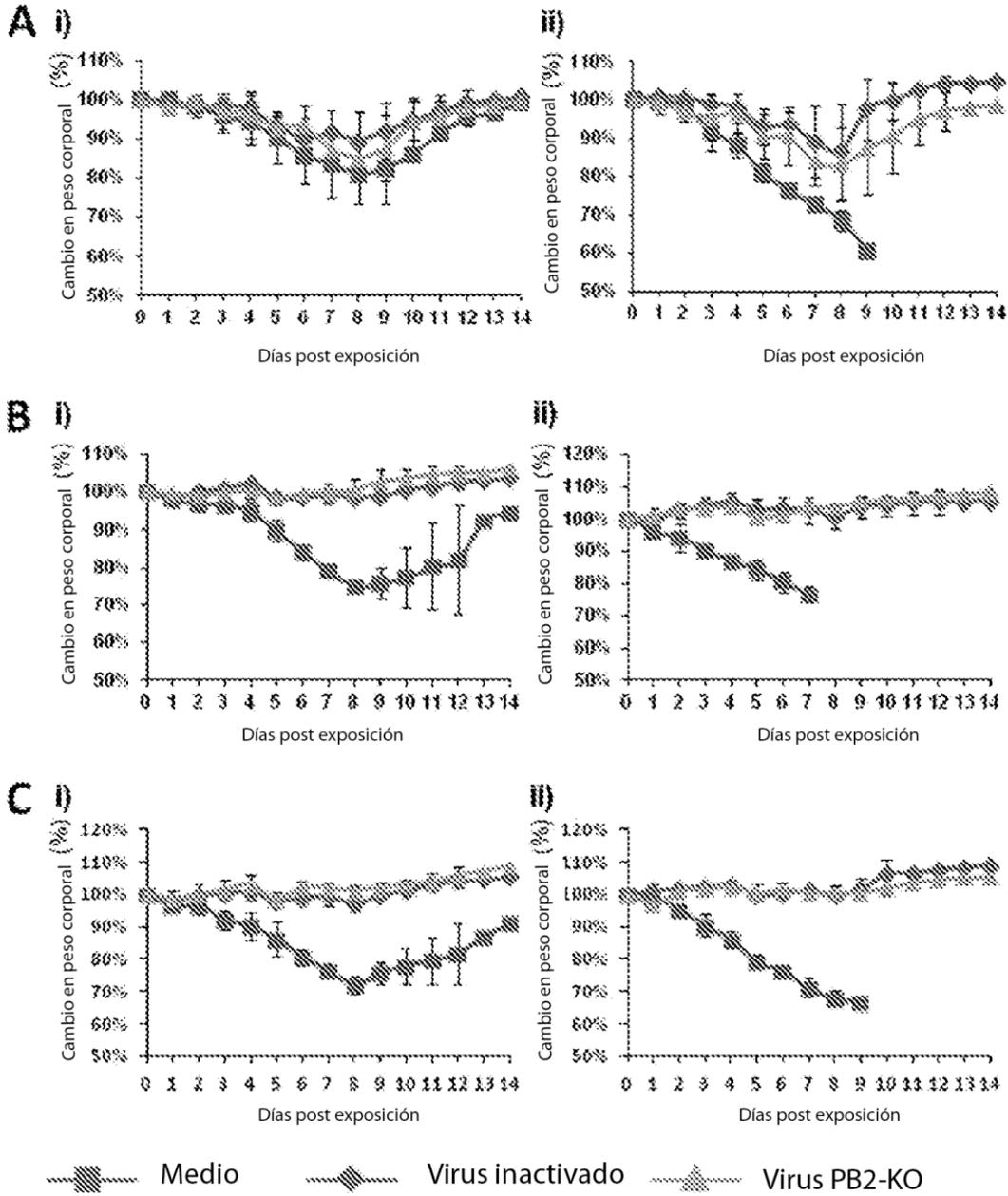


FIG. 7

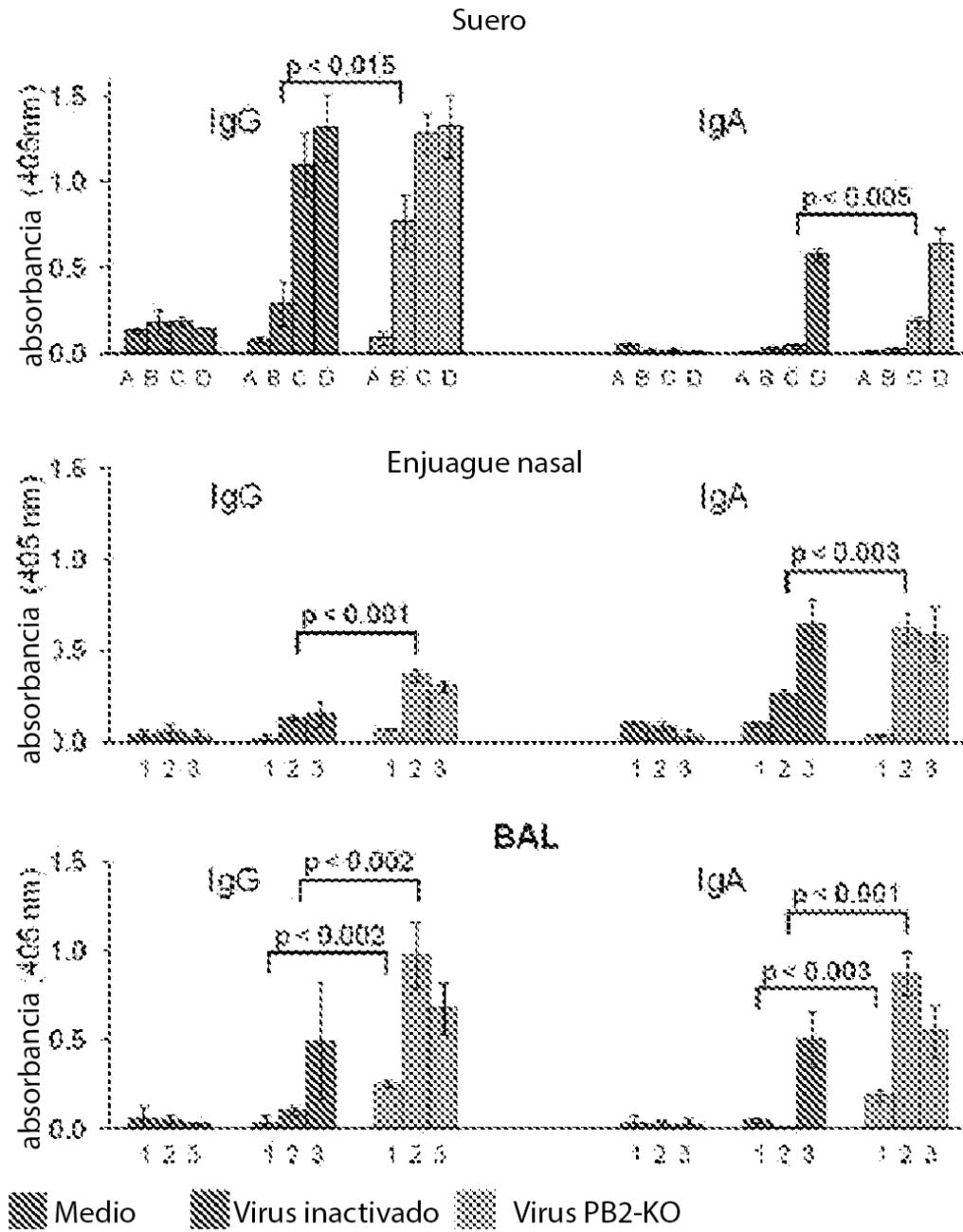


FIG. 8

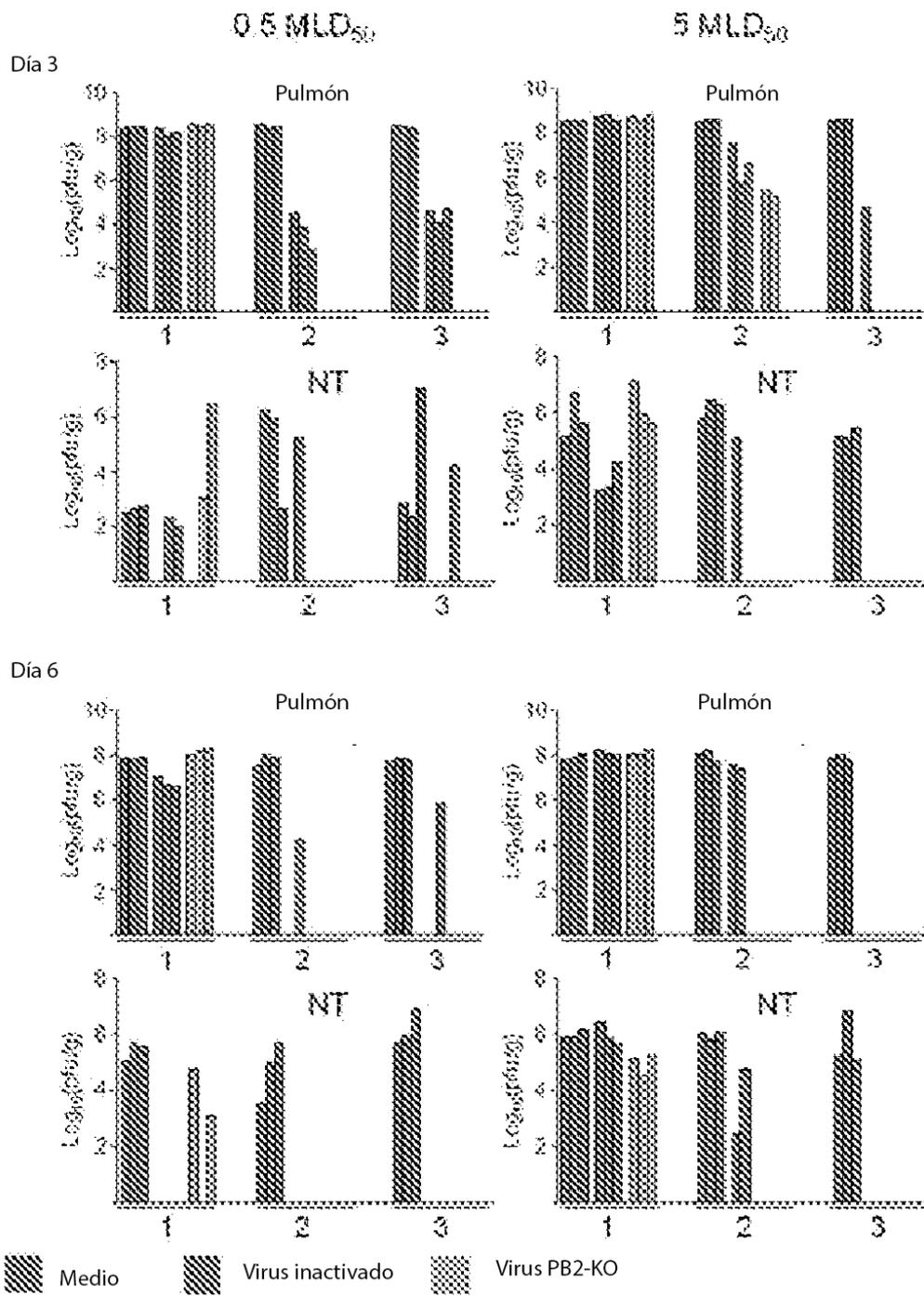


FIG. 9

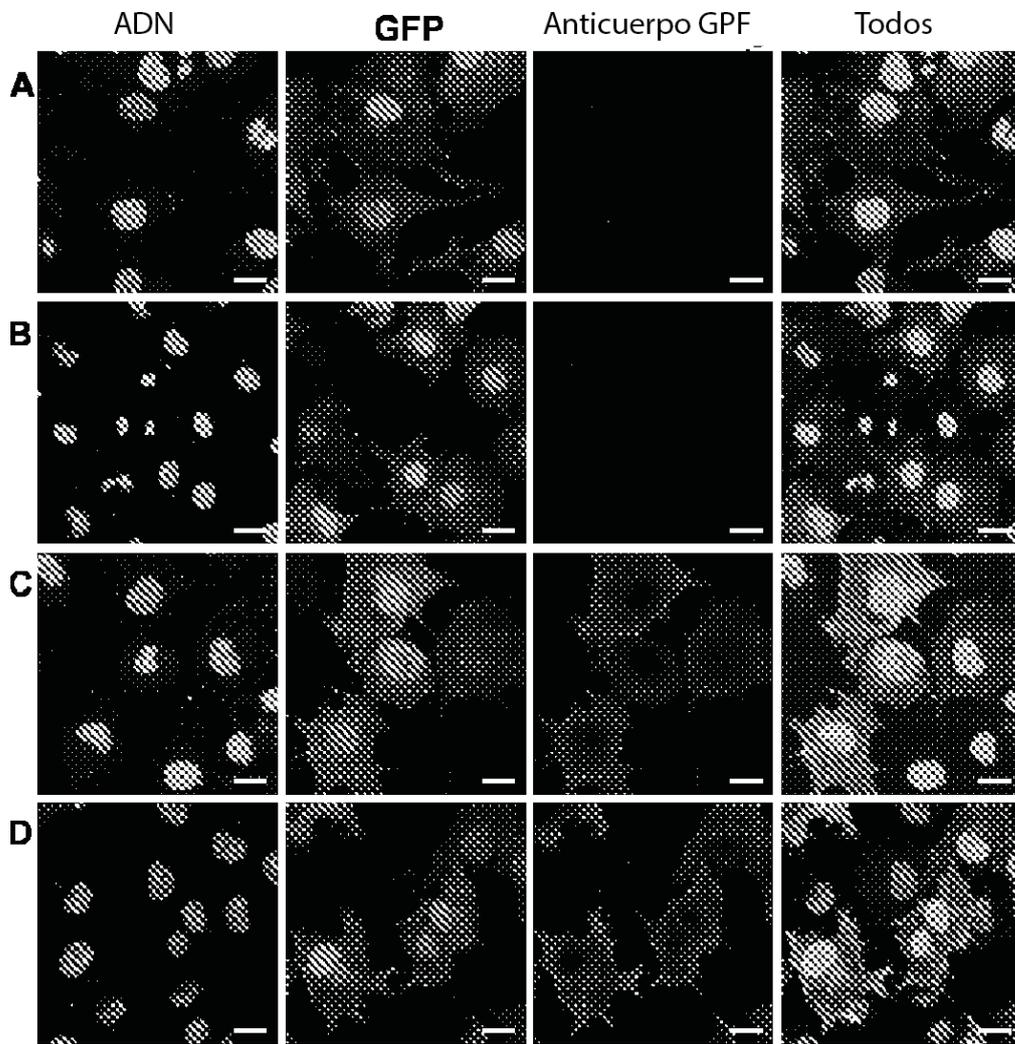


FIG. 10

Fig 11. Virus PB2K0 expresando pspA de neumococo

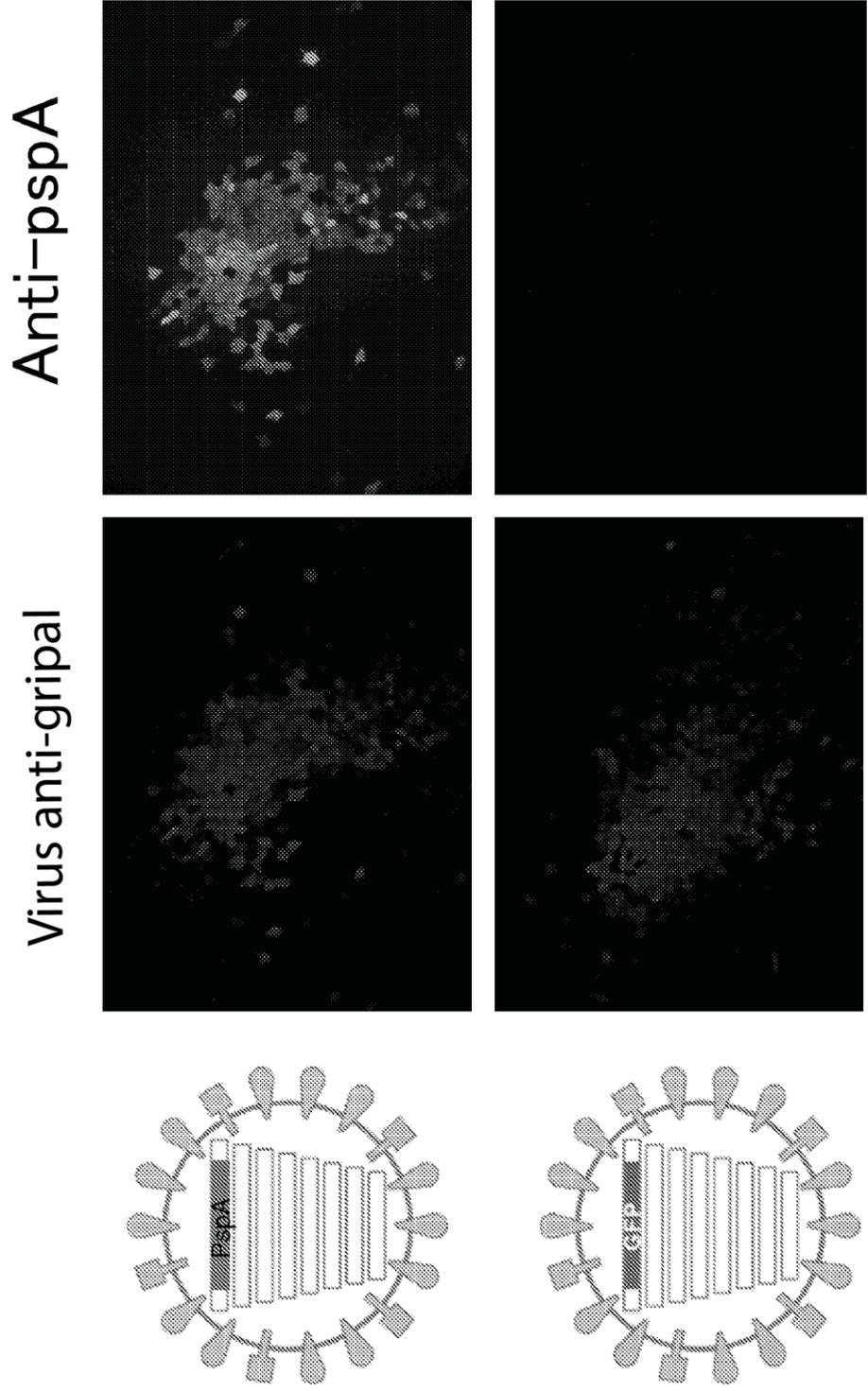


Fig 12. Cinética de crecimiento de virus PB2KO-PspA

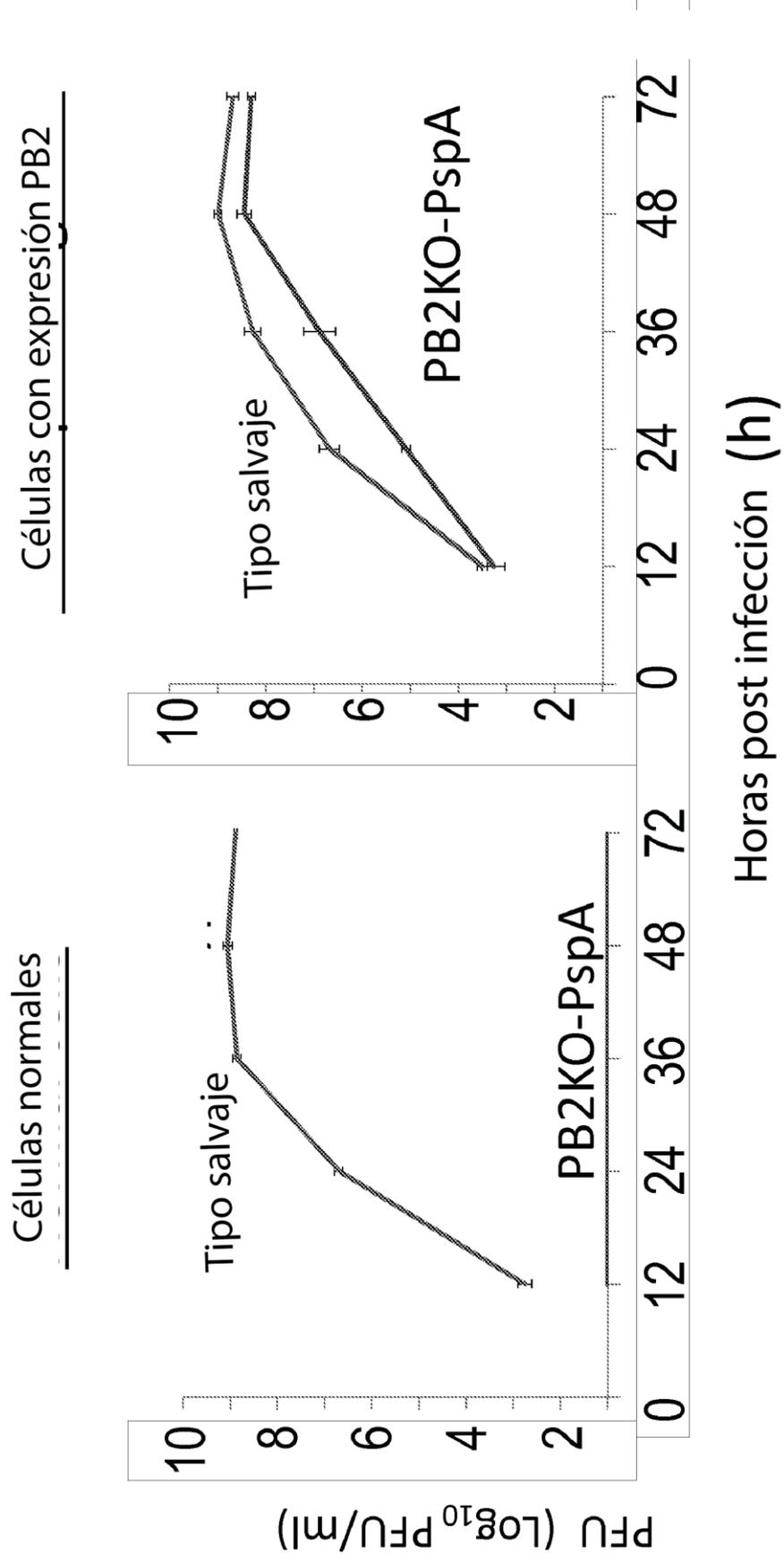


Fig 13. Virus anti-gripal específico de antígeno

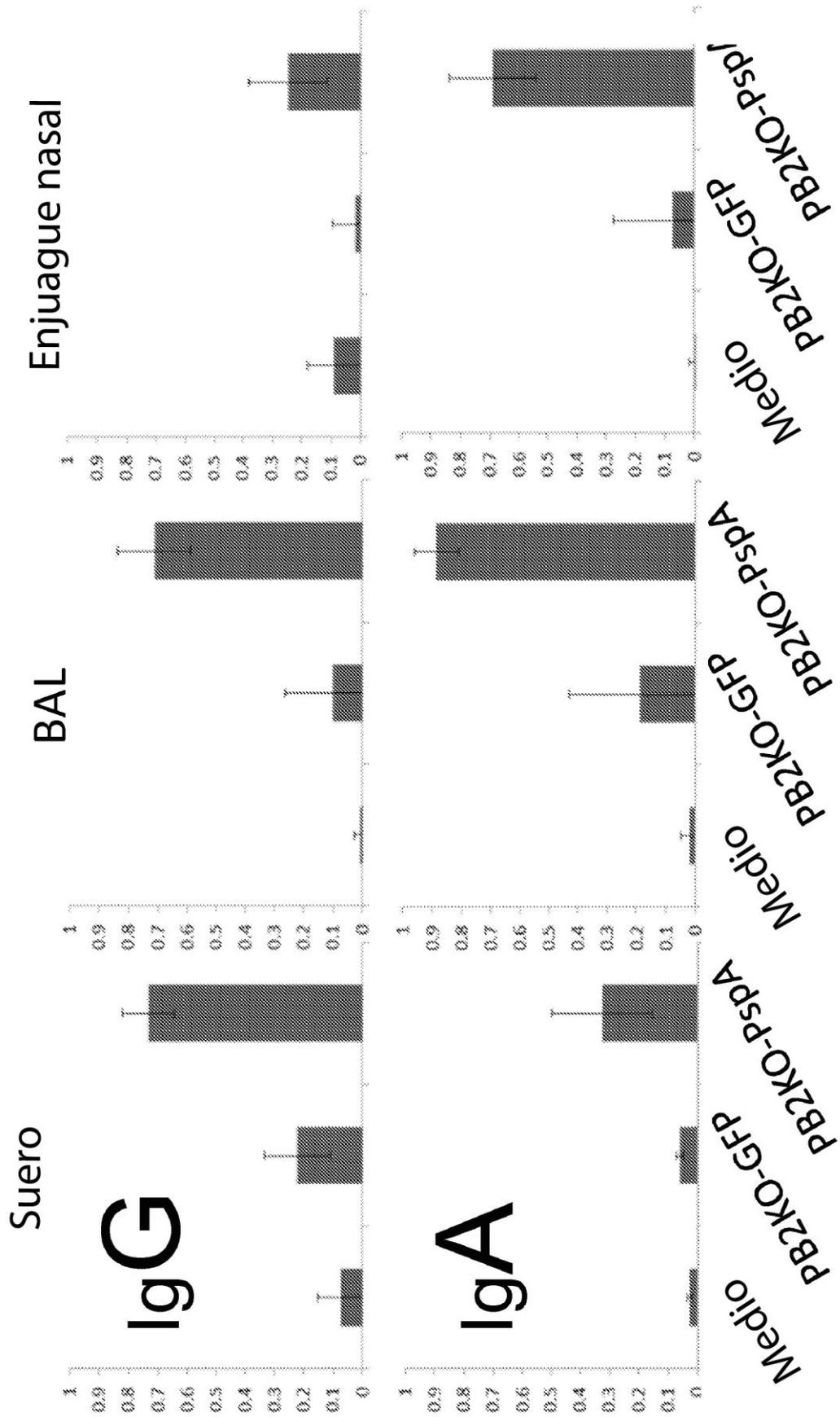
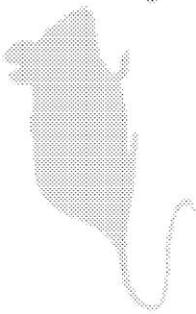
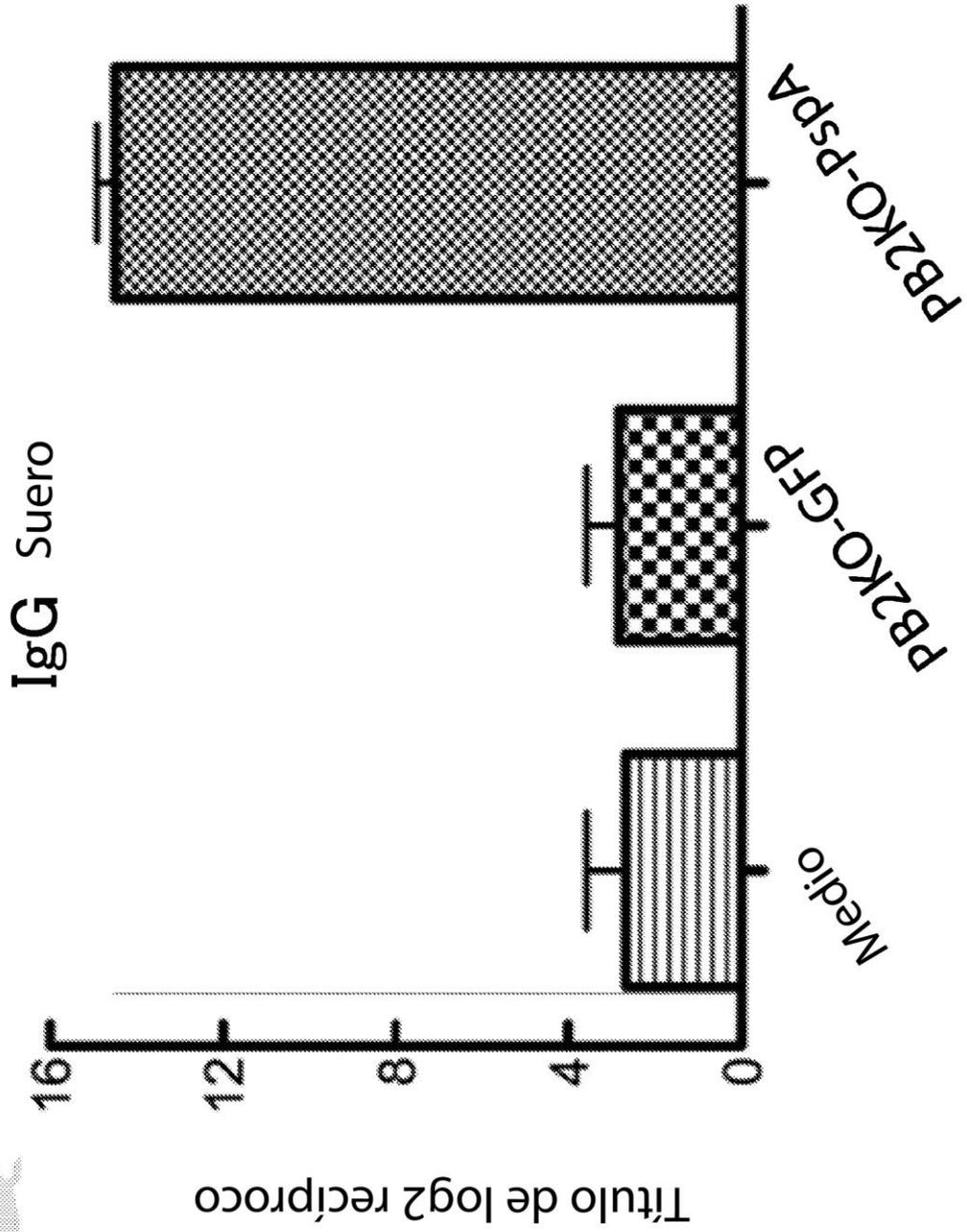
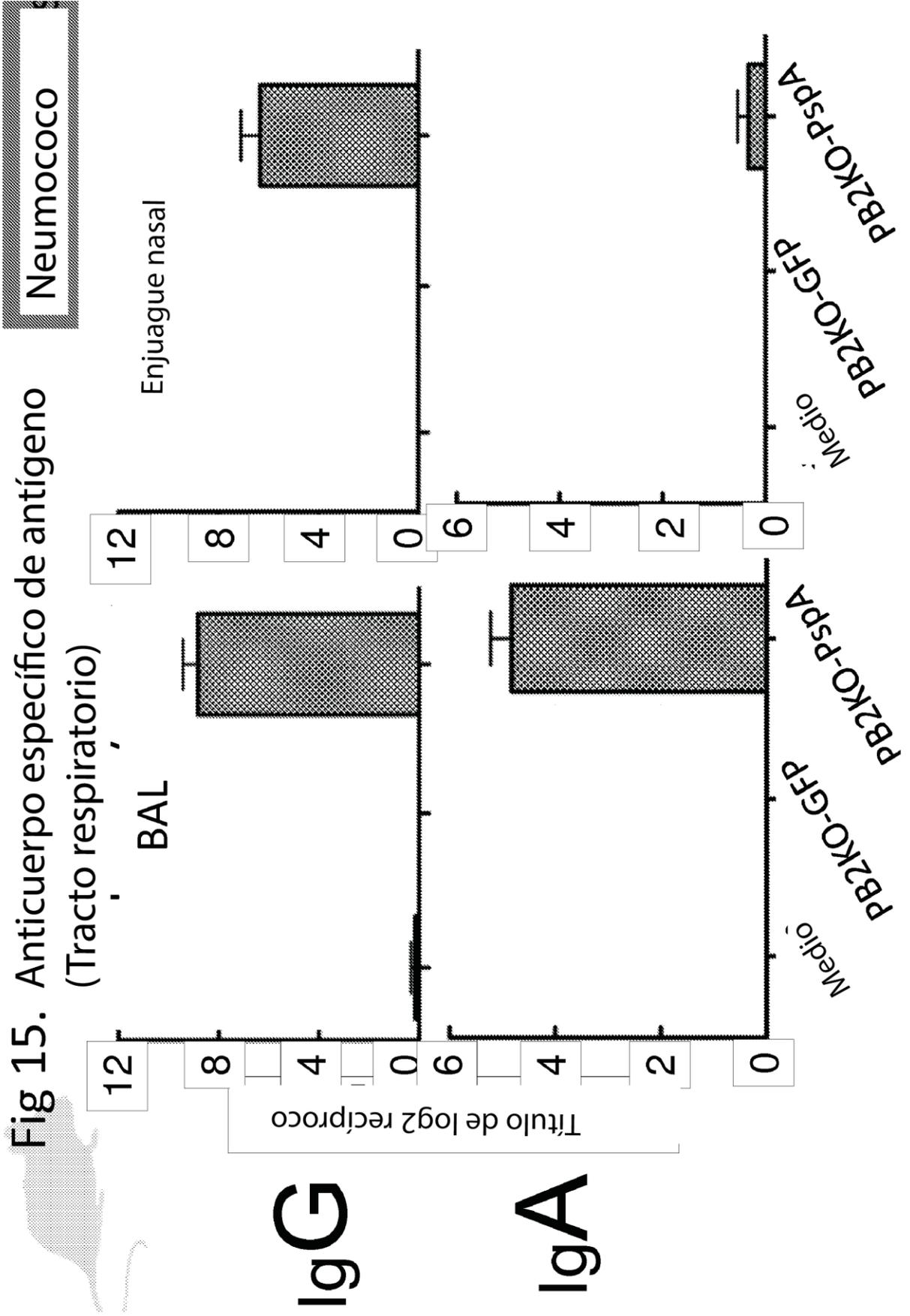


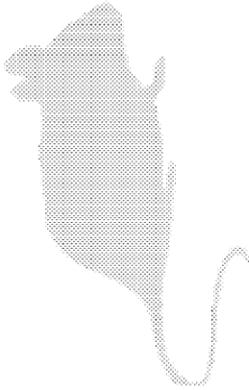
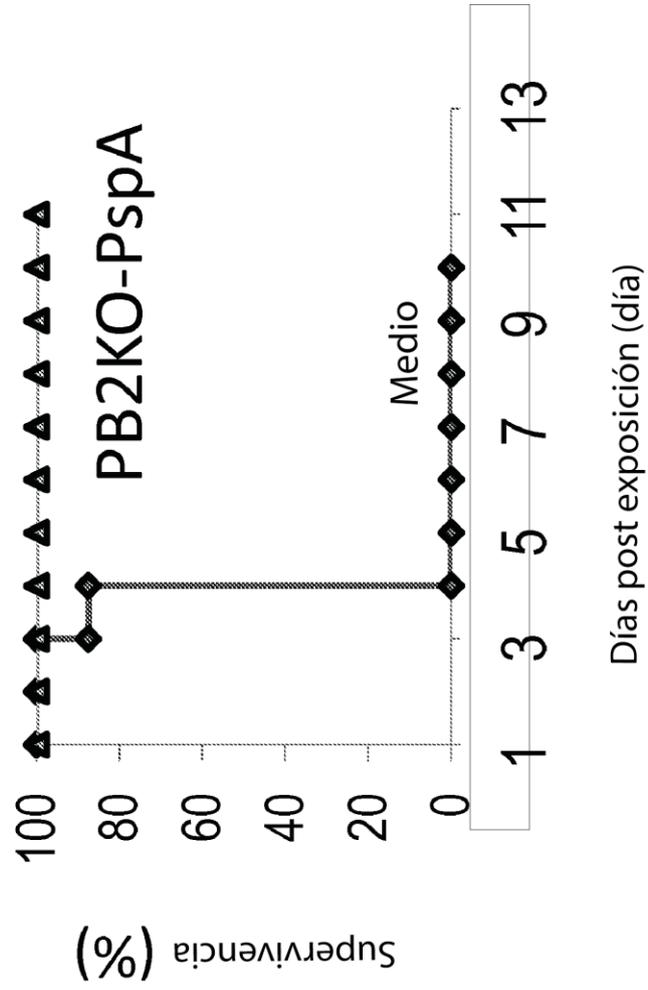
Fig 14. Neumococo anticuerpo específico de antígeno





Virus de la gripe

Fig 16. Supervivencia post exposición



Virus de la gripe

Fig 17. Replicación viral en el tracto respiratorio
(día 3 post exposición)

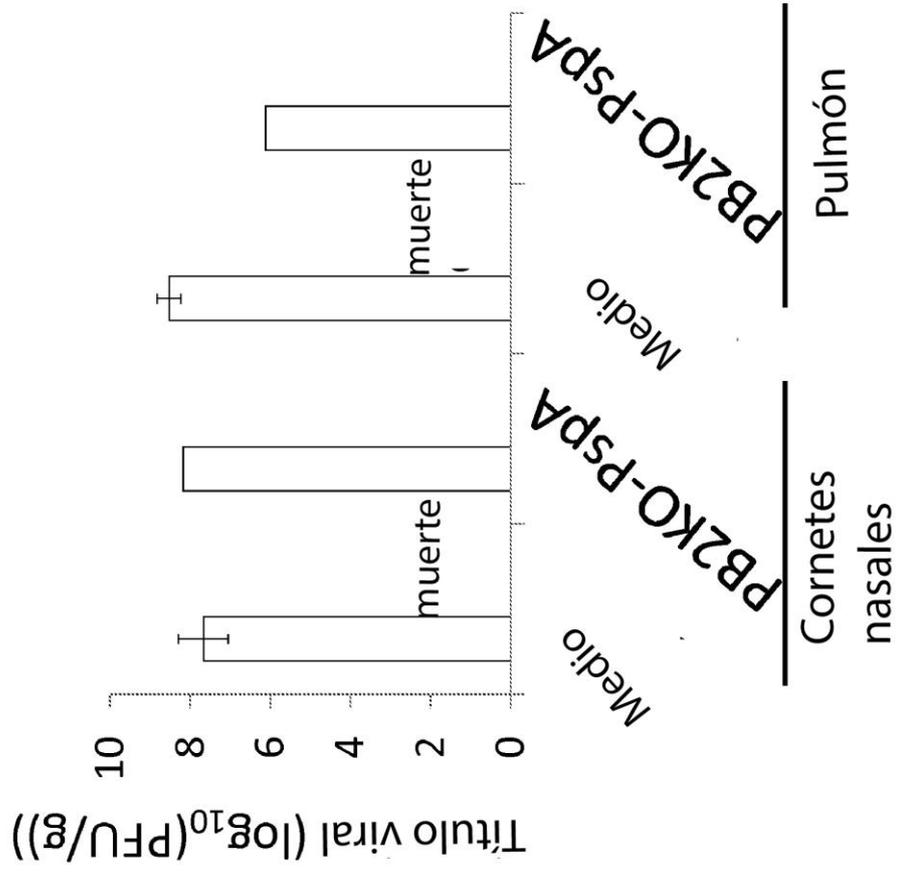
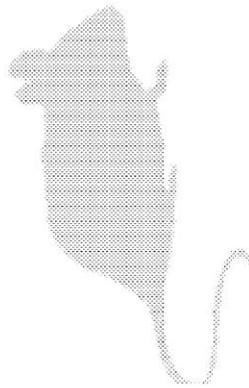
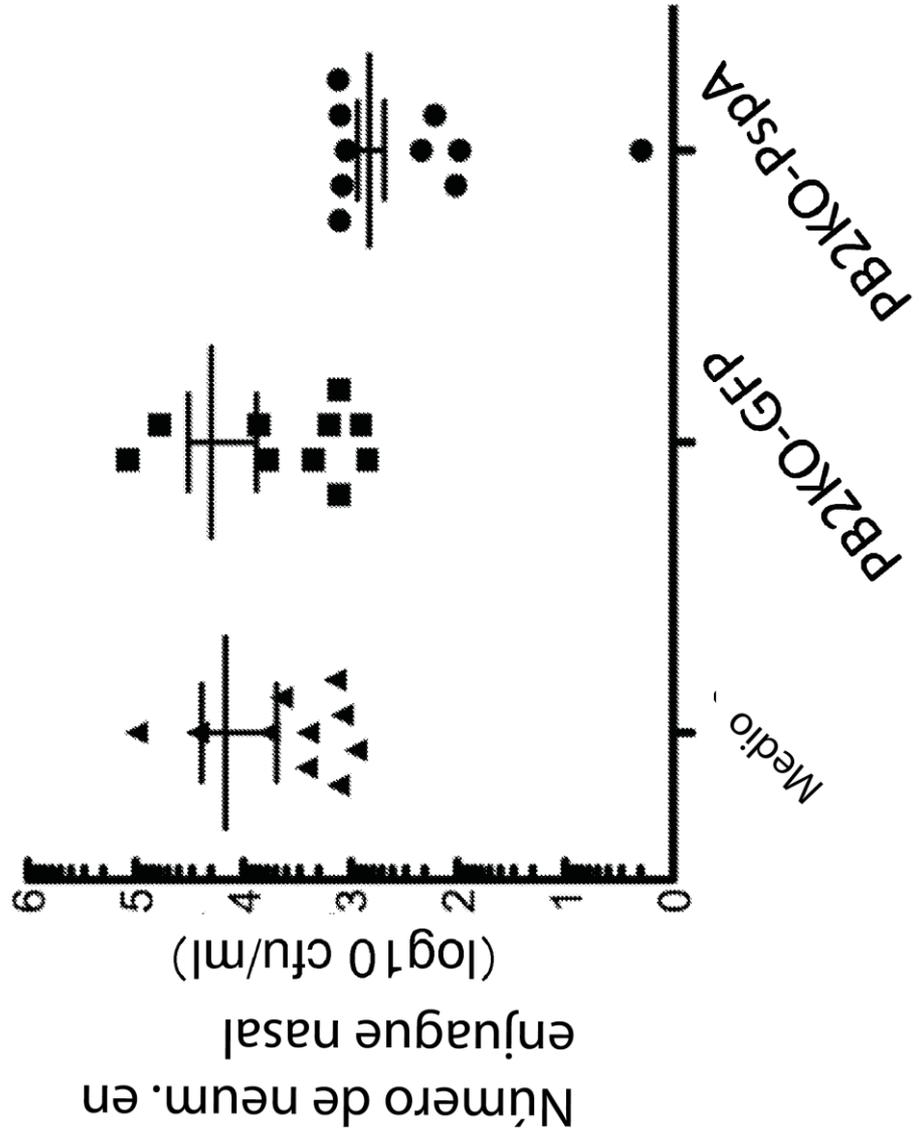




Fig 18. Número de neum. en enjuague nasal

Neumococo



Neumococo

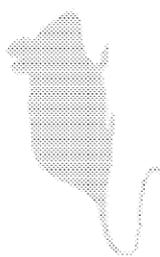


Fig 19. Supervivencia post exposición

