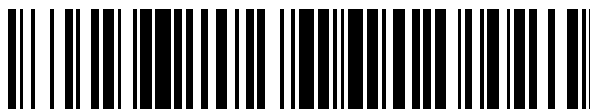


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 771**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2009** **PCT/US2009/068321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2010** **WO10077986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009** **E 09774806 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2376628**

54 Título: **Producción de vacunas contra el virus de la gripe**

30 Prioridad:

16.12.2008 US 122961 P

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

12.07.2018

73 Titular/es:

LOGY BIOSERVICES, INC. (100.0%)

13200 NW Nano Court

Alachua, Florida 32615, US

72 Inventor/es:

KISTNER, OTFRIED;

FALKNER, FALKO-GUENTER;

ERLICH, HARTMUT y

BARRETT, NOEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 675 771 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

Producción de vacunas contra el virus de la gripe

5 Producción de vacuna vírica

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N.º 61/122.961, presentada el 16 de diciembre de 2008.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a materiales y métodos para la producción de una vacuna mejorada contra el virus de la gripe. La invención proporciona un virus reagrupado que expresa hemaglutinina y neuraminidasa a partir de una cepa H5N1 del virus de la gripe A y que también tiene todos los genes internos de una cepa H5N1 diferente de la gripe A. Se contempla que el gen de la hemaglutinina se muta para presentar una acción patógena disminuida en comparación con el gen de la hemaglutinina en la cepa de tipo silvestre.

Antecedentes de la invención

La producción de vacunas eficientes requiere el crecimiento de grandes cantidades de virus producidos con altos rendimientos a partir de un sistema hospedador. Los diferentes tipos de virus requieren diferentes condiciones de crecimiento con el fin de obtener rendimientos aceptables. Por tanto, el hospedador en el que se cultiva el virus es de gran importancia. En función del tipo de virus, un virus puede cultivarse en células de cultivo de tejido primario, estirpes celulares establecidas o en huevos embrionados, tales como los de pollo.

Algunas de las estirpes celulares de mamífero que se usan como sistemas de hospedadores víricos producen virus en altos rendimientos, pero la naturaleza oncógena de dichas células invoca limitaciones reglamentarias contra su uso para la producción de vacunas. De hecho, las directrices aplicables de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que solo se permiten unas pocas estirpes celulares para la producción de vacunas de virus.

Existen tres tipos generales de los virus de la gripe, el tipo A, el tipo B y el tipo C, que se definen por la ausencia de reactividad cruzada serológica entre sus proteínas internas. Los virus de la gripe de tipo A se clasifican adicionalmente en subtipos basándose en las diferencias antigénicas de sus glucoproteínas, las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Los seres humanos son susceptibles a enfermedades provocadas por infección con cada uno de los virus de la gripe de tipo A, B y C.

Actualmente, las causas más importantes de las infecciones gripales en seres humanos son las atribuibles al tipo B y a los subtipos H1N1 y H3N2 de la gripe de tipo A. En consecuencia, los antígenos del tipo B y de los subtipos H1N1 y H3N2 de la gripe de tipo A son los que generalmente se incorporan en las presentes vacunas contra la gripe estacional. Las vacunas disponibles actualmente tienen tasas de protección que varían entre el 75-90 %. Sin embargo, las cepas de gripe que pueden provocar infección pandémica son, por ejemplo, del subtipo H5N1, del que no protegen las vacunas contra la gripe normales. Los subtipos H2, H7 y H9 también tienen potencial pandémico. Véase, por ejemplo, Koopmans et al., *Lancet* 363: 587-93, 2004; Joseph et al., *Md Med.* 6: 30-2, 2005; Cameron et al., *Virology* 278: 36-41, 2000; y Huber et al., *Pediatric Infect Dis* 27 (Supl. 10): S1 13-17, 2008.

Recientemente se han aprobado vacunas de virus de la gripe vivos atenuados para su uso en los Estados Unidos. Muchas vacunas actuales son para la infección de gripe estacional y contienen dos componentes de la gripe A, H1N1 y H3N2 y un componente de la gripe B. En los últimos años, al menos uno de los componentes se cambió cada año debido a la deriva antigénica y la mutación en las proteínas del virus de la gripe. Se toman aislados clínicos de virus de la gripe humana de pacientes infectados y se reagrupan en huevos de gallina embrionados con una cepa maestra adaptada en laboratorio de virus donante de alto crecimiento, la cepa del virus de la gripe A/PuertoRico/8/34 (H1N1) (patente de los EE.UU. 7.037.707). El objetivo de la reagrupación es aumentar el rendimiento de las cepas vacunales candidatas conseguidas por reagrupación de al menos los genes de HA o NA de los aislados clínicos primarios, con los seis genes internos del virus donante de la cepa maestra. Esta estrategia proporciona reagrupados de alto crecimiento que tienen determinantes antigénicos similares a las de los aislados clínicos (Wood, J. M. y Williams, M. S., *Textbook of Influenza*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1998; Robertson et al., *Biologicals*, 20: 213, 1992). Las vacunas se preparan mediante el cultivo de esta cepa vírica reagrupada en huevos embrionados y después inactivando el virus purificado por medios químicos.

Los virus de la gripe aviar altamente patógenos son capaces de provocar una enfermedad respiratoria grave y mortalidad en aves. Esta característica es conocida solo para la HA de los subtipos H5 y H7. Debido a la capacidad de algunos virus aviares para transmitirse a los seres humanos, también se convierten en un problema de salud humana. La acción patógena de los virus de la gripe aviar es una propiedad poligénica, pero se ha demostrado que la proteína HA tiene la función principal en la infección. Un requisito previo para la infectividad del virus es la escisión de la proteína HA precursora (HAO) en las subunidades HA1 y HA2. Esta escisión libera el péptido que es responsable de la fusión de membranas víricas y endosómicas. Los virus de baja acción patógena expresan

moléculas HA de superficie que se activan solamente por las proteasas similares a tripsina secretadas por células respiratorias o gastrointestinales (Perdue et al., *Virus Res* 49: 173-86, 1997). El sitio de escisión de los virus altamente patógenos se cambia de manera que pueda ser escindido por diferentes proteasas de la célula, especialmente por la furina ubicua que está presente en la mayoría de las células (Steinhauer D., *Virology* 258: 1-20, 1999; Swayne D., *Vet Pathol* 34, 557-67, 1997). Todas las cepas altamente patógenas contienen invariablemente múltiples restos básicos (como R y K) en el sitio de escisión (Perdue et al., citado anteriormente). Por tanto, el virus puede propagarse rápidamente y replicarse en casi cualquier órgano e inducir una infección sistémica.

Se han producido virus reagrupados H5N1 atenuados mediante genética inversa (RG, Palese et al., *Proc Natl Acad Sci* (EE.UU.) 93: 11354-58, 1996), usando los genes HA y NA de una cepa H5N1 y la inserción de estos genes en un virus "estructura principal" que comprende el resto de los genes internos del virus de la gripe de un virus que es menos patógeno. La estructura principal utilizada con frecuencia deriva de la cepa prototipo A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) del subtipo H1N1 que está altamente adaptada al crecimiento en huevos y solo las dos glucoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) derivan de un virus H5N1. Estos virus reagrupados están diseñados para la producción de vacunas en huevos, pero el crecimiento de los reagrupamientos de genética inversa existentes conocidos en la técnica es deficiente en huevos y en cultivo celular. Por ejemplo, Suguitan et al. (*PLoS Medicine* 3:1541-1554, 2006) describen el uso de la estructura principal adaptada al frío Ann Arbor (ca AA) para generar virus que tienen los genes HA y NA de las cepas H5N1, A/Hong Kong/213 y A/Vietnam/1203/2004. Estos virus demostraron la atenuación in vivo, es decir, no fueron letales en pollos, y también presentaron algunos efectos protectores en expuestos nuevamente al virus H5N1 de tipo silvestre. Shengqiang et al. (*J Infectious Dis* 179: 1132-8, 1999) también produjeron virus recombinantes usando genes de la HA y de la NA de una cepa Hong Kong pandémica y genes internos de la cepa Ann Arbor. El crecimiento de estos virus en huevos, sin embargo, no es el óptimo.

Análogamente, Ming, et al., *Chin. J. Biotech.* (2006) 22: 720-726, describieron, entre otras cosas, un virus reagrupado que comprende genes internos procedentes de las cepas víricas H9N2, con un gen de la HA modificado de una cepa H5N1 y un gen de NA de H2N3. Shi, et al., *Vaccine* (2007) 25: 73797384, describieron, entre otras cosas, un virus reagrupado que tiene genes internos de una cepa H9N2, con un gen de la HA modificado y un gen de NA de tipo silvestre de una cepa H5N1. Hickman, et al., (*J. Gen. Virol.* 89: 2682-2690, 2008), describieron, entre otras cosas, una vacuna que comprende genes de la estructura principal de una cepa H9N2 rescatada con genes de HA y/o NA de cepas H1N1, H5N1 y H7N2.

Estudios recientes han intentado generar vacunas que se han cultivado en cultivo de células de mamífero para evitar los problemas observados habitualmente con el crecimiento de virus en huevo, por ejemplo, el coste del sostenimiento y el mantenimiento de las instalaciones de huevos, la purificación de virus a partir de proteína de huevo y la alergia a la proteína de huevo residual. Las patentes de los EE.UU. 6.146.873 y 7.132.271, entre otras, analizan el desarrollo de estirpes de cultivo celular que sean capaces de producir virus de calidad para vacunas. Véase también Kistner et al., (*Vaccine* 16: 960-8, 1998), que desvelan células VERO adaptadas para la mejora del crecimiento vírico y la producción de vacunas, y Ehrlich et al., (*New Eng J Med* 35: 2573-84, 2008), que describieron, entre otros, una vacuna de virus entero H5N1 inactivada con formol cultivado en células Vero.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de producir una vacuna contra la gripe pandémica o estacional que tenga una antigenicidad aumentada en comparación con vacunas anteriores, que pueda desencadenar una buena respuesta inmunitaria en un hospedador sin provocar infección y que presente un crecimiento robusto en cultivo de células de mamífero.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona la producción de una vacuna mejorada contra el virus de la gripe, en la que la vacuna comprende un virus reagrupado que tiene un gen de la hemaglutinina y un gen de la neuraminidasa de la misma cepa del virus de la gripe A subtipo H5N1 y genes internos de una cepa virus de la gripe A subtipo H5N1 diferente. En un aspecto, los genes de la HA y de la NA y los genes internos derivan de una cepa H5N1 altamente patógena del virus de la gripe A.

En un aspecto, la invención proporciona un virus de la gripe reagrupado que comprende: segmentos de genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) de un primer virus de la gripe subtipo A y genes de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA) del subtipo del virus de la gripe de los que derivan los genes internos, los genes internos derivados de una primera cepa de un subtipo del virus de la gripe A y los genes de la HA y de la NA derivados de una segunda cepa en el subtipo del virus de la gripe A. Se contempla adicionalmente que el gen NS comprende un gen NS1, un gen NS2 o un gen NS1 y un gen NS2.

En una realización, la invención contempla un virus de la gripe reagrupado purificado que comprende segmentos de genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) de una cepa H5N1 del virus de la gripe A y genes de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) de un virus de la gripe A H5N1 diferente, los genes de la HA y de la NA derivados de

la misma cepa vírica. En una realización relacionada, los genes de la HA y de la NA son de un primer clado H5N1 y los genes internos son de un segundo clado H5N1. En una realización adicional, los genes de la HA y de la NA y los genes internos derivan del mismo clado. Se contempla adicionalmente que el gen NS comprende un gen NS1, un gen NS2 o un gen NS1 y un gen NS2.

5 El gen de la HA del virus reagrupado se modifica para producir un virus atenuado. El gen de la HA se modifica en un sitio de escisión polibásico. En una realización, la modificación en el sitio de escisión polibásico en el gen de la HA es la mutación de RERRRKKR (SEQ ID NO: 13) → TETR (SEQ ID NO: 14).

10 En otra realización, el virus se caracteriza por la capacidad para propagarse en cultivos de células de mamíferos. En una realización adicional más, las células de mamífero se seleccionan entre el grupo que consiste en células MRC-5, MRC-9, Lederle 130, hígado Chang y WI-38; U937, Vero, CV-1, IIVIR-90 y IMR-91, MDCK, MDBK, HEK, H9, CEM y HUT78 que expresan CD4, PerC6, células BHK-21, BSC y LLC-MK2. En una realización relacionada, el cultivo de células de mamífero es un cultivo de células Vero.

15 En una realización, los genes internos de los virus reagrupados derivan de un virus H5N1 conocido en la técnica y los que se describen en más detalle a continuación en la Descripción detallada. En una realización relacionada, dichos genes internos derivan de la cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05, A/Hong Kong/156/97, A/pavo/Turquía/01/2005, A/Anhui/1/05 y A/Camboya/R0405050/2007, A/pollo/Nakorn-Patom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDK/JX/1653/05, MDK/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05, MDK/JX/1701/05, MDK/JX/2136/05, MDK/JX/2295/05, MDK/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5858/04, Ck/Salatiga/BBVet-I/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/CS5/OS, A/pato criollo/Vietnam/453/2004 A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996. En una realización específica, los genes internos son de A/Vietnam/1203/2004.

20 En otra realización, los genes de la HA y de la NA del virus reagrupado derivan de un virus H5N1 conocido en la técnica y de los que se describen en más detalle a continuación. En una realización adicional, dichos genes de la HA y de la NA derivan de una cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05, A/Hong Kong/156/97, A/pavo/Turquía/01/2005, A/Anhui/1/05 y A/Camboya/R0405050/2007, A/pollo/Nakorn-Patom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDK/JX/1653/05, MDK/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05, MDK/JX/1701/05, MDK/JX/2136/05, MDK/JX/2295/05, MDK/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5858/04, Ck/Salatiga/BB-Vet-I/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/C58/05, A/pato criollo/Vietnam/453/2004 A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996.

Los genes internos y los genes de la HA y de la NA derivan de la misma cepa de virus.

40 En una realización, los genes de la HA y de la NA son de la cepa H5N1 A/Vietnam/1203/2004. En otra realización, los genes de la HA y de la NA son de la cepa H5N1 A/Indonesia/5/05.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición antigénica de virus de la gripe reagrupado que comprende: segmentos de genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) de un primer virus de la gripe A del subtipo H5N1 y genes de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA) del subtipo del virus de la gripe del que derivan los genes internos, los genes internos derivados de una primera cepa de un subtipo del virus de la gripe A y los genes de la HA y de la NA derivados de una segunda cepa en el subtipo del virus de la gripe A. Se contempla adicionalmente que el gen NS comprenda un gen NS1, un gen NS2 o un gen NS1 y un gen NS2.

50 En una realización, la composición antigénica de virus de la gripe A, comprende segmentos internos de genes (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) derivadas de una cepa H5N1 del virus de la gripe A y genes de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA) derivados de un virus de la gripe A H5N1 de una cepa diferente, los genes de la HA y de la NA deriva de la misma cepa vírica. Se contempla adicionalmente que el gen NS comprenda un gen NS1, un gen NS2 o un gen NS1 y un gen NS2.

55 El gen de la HA de las composiciones se modifica para producir un virus atenuado. El gen de la HA se modifica en un sitio de escisión polibásico.

60 En una realización adicional, el virus de la gripe se caracteriza por la capacidad de propagarse en cultivos de células de mamíferos.

65 En una realización, los genes internos de la composición antigénica derivan de un virus H5N1 conocido en la técnica y de los que se describen en más detalle a continuación. En una realización relacionada, dichos genes internos derivan de la cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05 A/pollo/Nakorn-Patom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDK/JX/1653/05, MDK/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05,

MDk/JX/1701/05, MDk/JX/2136/05, MDk/JX/2295/05, MDk/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5858/04, Ck/Salatiga/BBVet-1/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/C58/05, A/pato criollo/Vietnam/453/2004 A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996. En una realización específica, los genes internos son de A/Vietnam/1203/2004.

En otra realización, los genes de la HA y de la NA de la composición antigénica derivan de un virus H5N1 conocido en la técnica y de los que se describen en más detalle a continuación. En una realización adicional, dichos genes de la HA y de la NA derivan de una cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05, A/Hong Kong/156/97, A/pavo/Turquía/01/2005, A/Anhui/1/05 y A/Camboya/R0405050/2007, A/pollo/NakornPatom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDk/JX/1653/05, MDk/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05, MDk/JX/1701/05, MDk/JX/2136/05, MDk/JX/2295/05, MDk/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5858/04, Ck/Salatiga/BBVet-1/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/C58/05, A/pato criollo/Vietnam/453/2004 A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996.

Los genes internos y los genes de la HA y de la NA de la composición antigénica derivan de la misma cepa de virus.

En una realización, los genes de la HA y de la NA de la composición antigénica son de la cepa H5N1 A/Vietnam/1203/2004. En otra realización, los genes de la HA y de la NA son de la cepa H5N1 A/Indonesia/5/05.

En una realización adicional más, la modificación en el sitio de escisión polibásico en el gen de la HA es una mutación de RERRRKKR (SEQ ID NO: 13) → TETR (SEQ ID NO: 14).

En otra realización, la composición antigénica comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención contempla una vacuna que comprende un virus de la gripe reagrupado, comprendiendo el virus: i) un polinucleótido que codifica la proteína de superficie HA y un polinucleótido que codifica la proteína de superficie NA, cada una de HA y NA derivada de una primera cepa del subtipo H5N1 del virus de la gripe A; un polinucleótido que codifica PB1; un polinucleótido que codifica PA, un polinucleótido que codifica PB2, un polinucleótido que codifica M, un polinucleótido que codifica NS (NS1 y/o NS2), un polinucleótido que codifica NP, los polinucleótidos para PB1, PB2, PA, NP, M y NS derivados de una segunda cepa del subtipo H5N1 del virus de la gripe A, en la que los polinucleótidos están operativamente unidos para permitir el empaquetamiento de los polinucleótidos reagrupados en un virión.

En una realización relacionada, la invención proporciona una vacuna que comprende un virus de la gripe A reagrupado, comprendiendo el virus: un polinucleótido que codifica la proteína de superficie HA y un polinucleótido que codifica la proteína de superficie NA, cada una de HA y NA derivada de una cepa del virus de la gripe H5N1; un polinucleótido que codifica PB1; un polinucleótido que codifica PA, un polinucleótido que codifica PB2, un polinucleótido que codifica M, un polinucleótido que codifica NS1 (NS1 y/o NS2), un polinucleótido que codifica NP, los polinucleótidos para PB1, PA, PB2, M, NP y NS) derivados de una cepa de virus de la gripe H5N1 diferente, estando los polinucleótidos unidos operativamente para permitir el empaquetamiento de los polinucleótidos reagrupados en un virión.

El gen de la HA de las composiciones se modifica para producir un virus atenuado. El gen de la HA se modifica en un sitio de escisión polibásico.

En una realización, los genes internos de la vacuna derivan de un virus H5N1 conocido en la técnica y de los que se describen en más detalle a continuación. En una realización relacionada, dichos genes internos derivan de la cepa H5N1 A/Vietnam/1203/2004.

En otra realización, los genes de la HA y de la NA de la vacuna derivan de un virus H5N1 conocido en la técnica y de los que se describen en más detalle a continuación. En una realización adicional, dichos genes de la HA y de la NA derivan de una cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05, que A/Hong Kong/156/97, A/pavo/Turquía/01/2005, A/Anhui/1/05 y A/Camboya/R0405050/2007, A/pollo/NakornPatom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDk/JX/1653/05, MDk/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05, MDk/JX/1701/05, MDk/JX/2136/05, MDk/JX/2295/05, MDk/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5858/04, Ck/Salatiga/BBVet-1/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/C58/05, A/pato criollo/Vietnam/453/2004 A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996.

Los genes internos y los genes de la HA y de la NA de la vacuna derivan de la misma cepa de virus.

En una realización, los genes de la HA y de la NA de la vacuna son de la cepa H5N1 A/Vietnam/1203/2004. En otra realización, los genes de la HA y de la NA son de la cepa H5N1 A/Indonesia/5/05.

En una realización adicional más, la modificación en el sitio de escisión polibásico en el gen de la HA es una mutación de RERRRKKR (SEQ ID NO: 13) → TETR (SEQ ID NO: 14).

En otra realización, la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante. Los adyuvantes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a saponina, detergentes no iónicos, aceite vegetal, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianinas de lapa californiana y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina, BCG (bacilo de Calmette-Guerin) Corynebacterium parvum, ISCOM, nano-perlas, escualeno y copolímeros de bloque, que se contemplan para su uso solos o en combinación.

En una realización adicional, la vacuna es una vacuna inactivada. Se contempla que la inactivación se realiza usando métodos y agentes conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, formaldehído, irradiación UV, glutaraldehído, etilenimina binaria (BEI) y beta-propiolactona. También se contempla que la vacuna se administre en forma de una vacuna de virus vivo atenuado.

En una realización, la vacuna comprende un contenido de HA de 1 µg a 75 µg de HA. En una realización adicional, la vacuna comprende un contenido de HA de 1 µg a 30 µg por vacuna. En realizaciones relacionadas, la dosis de vacuna se administra a 1 µg, a 3 µg, a 5 µg, a 7,5 µg, a 10 µg, a 12,5 µg, a 15 µg, a 20 µg, a 25 µg, a 30 µg de HA, o en cualquier cantidad hasta 100 µg de HA según sea necesario. En consecuencia, las dosificaciones de vacunas individuales incluyen las que tienen aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 3 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 8 µg, aproximadamente 9 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 11 µg, aproximadamente 12 µg, aproximadamente 13 µg, aproximadamente 14 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 16 µg, aproximadamente 17 µg, aproximadamente 18 µg, aproximadamente 19 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 21 µg, aproximadamente 22 µg, aproximadamente 23 µg, aproximadamente 24 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 35 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 55 µg, aproximadamente 60 µg, aproximadamente 65 µg, aproximadamente 70 µg, aproximadamente 75 µg, aproximadamente 80 µg, aproximadamente 85 µg, aproximadamente 90 µg, aproximadamente 95 µg, aproximadamente 100 µg y más de 100 µg de hemaglutinina proporcionada en dosificaciones individuales o múltiples a la misma o diferente cantidad de hemaglutinina.

En otro aspecto, se desvela un método para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a al menos una cepa de virus de la gripe pandémico en un sujeto, que comprende administrar un virus, composición antigénica o una vacuna como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz para proteger al sujeto frente a la infección de al menos una cepa del virus de la gripe H5N1. En un aspecto relacionado, se desvela un método para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a al menos una cepa de virus de la gripe estacional en un sujeto, que comprende administrar un virus, composición antigénica o una vacuna como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz para proteger al sujeto frente a la infección de al menos una cepa del virus de la gripe A y/o de la gripe B.

En un aspecto adicional, se desvela un método para prevenir la infección de un sujeto por un virus de la gripe H5N1 que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus, composición antigénica o una vacuna como se describe en el presente documento. En otro aspecto, se desvela un método para prevenir la infección de un sujeto por un virus de la gripe A o de la gripe B que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus, composición antigénica o una vacuna como se describe en el presente documento.

En una realización, la vacuna útil en los métodos de la invención comprende un contenido de HA de 1 µg a 75 µg HA. En otra realización, la vacuna comprende un contenido de HA de 1 µg a 30 µg por vacuna. En realizaciones relacionadas, la dosis de vacuna se administra a 1 µg, a 3 µg, a 5 µg, a 7,5 µg, a 10 µg, a 12,5 µg, a 15 µg, a 20 µg, a 25 µg, a 30 µg de HA o en cualquier cantidad hasta 100 µg de HA según sea necesario. En consecuencia las dosificaciones de vacunas individuales incluyen las que tienen aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 3 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 8 µg, aproximadamente 9 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 11 µg, aproximadamente 12 µg, aproximadamente 13 µg, aproximadamente 14 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 16 µg, aproximadamente 17 µg, aproximadamente 18 µg, aproximadamente 19 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 21 µg, aproximadamente 22 µg, aproximadamente 23 µg, aproximadamente 24 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 35 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 55 µg, aproximadamente 60 µg, aproximadamente 65 µg, aproximadamente 70 µg, aproximadamente 75 µg, aproximadamente 80 µg, aproximadamente 85 µg, aproximadamente 90 µg, aproximadamente 95 µg, aproximadamente 100 µg y más de 100 µg de hemaglutinina proporcionada en dosificaciones individuales o múltiples a la misma o diferente cantidad de hemaglutinina.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de fabricación de una vacuna que comprende un virus de la gripe reagrupado que comprende segmentos de genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) de una cepa H5N1 del virus de la gripe A y genes de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA) de un virus de la gripe A H5N1 diferente, los genes de la HA y de la NA derivados de la misma cepa vírica y el gen de la HA modificado en un sitio de escisión polibásico para producir un gen de la HA atenuado, comprendiendo el método transfectar el virus en células de mamífero en condiciones adecuadas para el crecimiento del virus reagrupado. En una realización relacionada, el método de fabricación de una vacuna descrita en el presente documento es útil para fabricar una vacuna que comprende una cepa de virus de la gripe estacional del tipo de la gripe A o de la gripe B.

En una realización, las células de mamífero se seleccionan entre el grupo que consiste en MRC-5, MRC-9, Lederle 130, hígado Chang y WI-38; U937, Vero, CV-1, IMR-90 y IMR91, MDCK, MDBK, HEK, H9, CEM y HUT78 que expresan CD4, PerC6, células BHK-21, BSC y LLC-MK2. En una realización relacionada, las células de mamífero son células Vero.

Se excluyen de la presente invención cualesquier virus (de la gripe A y de la gripe B) desvelados o producidos anteriormente, por ejemplo, usando estructuras principales tales como A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/Leningrado/134/17/57 (H2N2) y B/Ann Arbor/1/66, que tienen genes internos de una cepa de un primer subtipo y los genes de la HA y de la NA de una cepa diferente del mismo subtipo, en cualesquiera publicaciones anteriores referenciadas en el presente documento, incluyendo, pero no limitadas a: Patentes de los EE.UU. 4.552.758; 7.037.707; 7.601.356; 7.566.458; 7.527.800; 7.510.719; 7.504.109; 7.465.456; y 7.459.162; Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 20090297554, 20090246225, 20090208527, 20090175909, 20090175908, 20090175907, 20090136530, 20080069821, 20080057081, 20060252132, 20060153872, 20060110406, 20050158342, 20050042229 y 20070172929; Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 2008/157583, WO 2008/021959, WO 2007/048089, WO 2006/098901, WO 2006/063053, WO 2006/041819, WO 2005/116260, WO 2005/116258, WO 2005/115448, WO 2005/062820, WO 2003/091401 y cualesquier virus identificados en las mismas como útiles para la vacuna FLUMIST™, que puede contener genes internos de una cepa de subtipo del virus de la gripe A y genes de la HA y de la NA de una cepa diferente del mismo subtipo en un virus recombinante.

En una realización, la presente invención también excluye virus reagrupados de origen natural que comprendan una estructura principal de una primera cepa de un subtipo del virus de la gripe y genes de la HA y de la NA de una segunda cepa del mismo subtipo del virus de la gripe. La expresión "virus reagrupado de origen natural" como se usa en el presente documento se refiere a un virus reagrupado que se recombina en un entorno natural, por ejemplo, el hospedador vírico, sin la intervención de una fuente externa.

En una realización adicional, la invención excluye virus reagrupados que tengan uno o más genes internos modificados de un primer subtipo del virus de la gripe A o B como estructura principal, por ejemplo, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) o B/Ann Arbor/1/66 mutados, y genes de la HA y de la NA de la misma cepa del virus de la gripe, por ejemplo, como se ejemplifica en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 20070172929. La invención contempla, sin embargo, que un virus que comprende genes internos modificados de la cepa de estructura principal de un subtipo del virus de la gripe y genes de la HA y de la NA del mismo subtipo, pero diferentes cepas, se incluya dentro del alcance de la invención.

En otra realización más, la invención excluye virus reagrupados generados usando virus adaptados al frío como la cepa de estructura principal/donante, por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/Leningrado/134/17/57 (H2N2), B/Ann Arbor/1/66 y otros conocidos en la técnica, en los que los genes de estructura principal internos son de un primer subtipo y los genes de la HA y de la NA son de una cepa diferente del mismo subtipo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la modificación de las secuencias de nucleótidos del sitio de escisión de la HA de A/Vietnam/1203/04 (H5N1) y otras secuencias de genes internos usando regiones no codificantes derivadas de A/Hong Kong/213/03. Las secuencias derivadas de A/Hong Kong están subrayadas.

La Figura 2 muestra la modificación de las secuencias de nucleótidos del sitio de escisión de la HA de A/Indonesia/5/05 (H5N1) y otras secuencias de genes internos usando regiones no codificantes derivadas de A/Hong Kong/213/03. Las secuencias derivadas de A/Hong Kong están subrayadas.

La Figura 3 muestra la modificación de las secuencias de nucleótidos del sitio de escisión de la HA de A/Pavo/Turquía/1/05 (H5N1) y otras secuencias de genes internos usando regiones no codificantes derivadas de A/Hong Kong/213/03. Las secuencias derivadas de A/Hong Kong están subrayadas.

La Figura 4 muestra la modificación de las secuencias de nucleótidos del sitio de escisión de la HA de A/Anhui/1/05 (H5N1) y otras secuencias de genes internos usando regiones no codificantes derivadas de A/Hong Kong/213/03. Las secuencias derivadas de A/Hong Kong están subrayadas.

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

5 La presente invención proporciona una vacuna mejorada que comprende un virus reagrupado que tiene ambas proteínas víricas estructurales, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) y los genes internos víricos [PB1, PB2, PA, NS (NS1, NS2), M1, M2 y NP] derivados de diversas cepas H5N1 del virus de la gripe. Son vacunas de la invención aquellas en las que los genes internos víricos derivan de una cepa del virus de la gripe específica y los genes de la HA y de la NA derivan de la misma cepa, pero la cepa de la que derivan los genes internos es una cepa del virus de la gripe A que es diferente de la cepa del virus de la gripe A de la que derivan los genes de la HA y de la NA. Los genes de la HA y de la NA derivan del mismo subtipo del virus de la gripe A. Las cepas del virus de la gripe A incluyen dieciséis subtipos de HA y nueve subtipos de NA. El virus reagrupado es susceptible de crecimiento eficiente en cultivo celular, que es un método mejorado de producción con respecto al método tradicional de crecimiento en huevos embrionados.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos utilizados en la presente invención: Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2ª Ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5ª ED., R. Rieger, et al. (editores), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

25 Se hace notar en el presente documento que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos a menos que se especifique lo contrario

La expresión "virus reagrupado" es un virus en el que se combinan segmentos génicos que codifican proteínas antigénicas (por ejemplo, genes de la hemaglutinina y de la neuraminidasa) de una cepa de virus de interés con segmentos génicos que codifican genes del complejo de la polimerasa vírica (PB2, PB1 y PA) u otros genes similares (por ejemplo, genes no de glucoproteína, incluyendo genes M y genes NS y genes de nucleoproteína (NP)) de virus de una cepa diferente. Una "cepa" como se usa en el presente documento se refiere a la variante vírica particular de una especie dada, por ejemplo, la especie del virus de la gripe A o B, y subtipo en un virus de la gripe A. Por ejemplo, el virus A/Vietnam/1203/2004 es un virus de la gripe A, subtipo H5N1, con el nombre de cepa A/Vietnam/1203/2004.

40 La expresión "derivado de" se refiere a toda o una porción de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que está alterada o mutada a partir de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de tipo silvestre o de origen natural, en la que el polinucleótido o polipéptido derivado de la secuencia de tipo silvestre está alterado en una o más bases o aminoácidos de manera que ya no tiene la misma secuencia que la secuencia de tipo silvestre.

45 El término "subtipo" como se usa en el presente documento se refiere a los diferentes virus dentro de las cepas del virus de la gripe A que pueden dividirse en subtipos basándose en los genes de la HA y de la NA que se expresan en la cepa de virus. La nomenclatura de los subtipos del virus de la gripe A se basa en el subtipo de HA, por ejemplo, el subtipo es uno cualquiera de los 16 diferentes genes de la HA conocidos en la técnica y el subtipo de NA, por ejemplo, cualquiera de los 9 diferentes genes de la NA conocidos en la técnica. Los subtipos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, H5N1, H1N1, H3N2 y muchos más conocidos en la técnica.

50 El término "clado" como se usa en el presente documento se refiere a las diferentes categorizaciones de los virus de la gripe A H5N1 que existen. Los virus en un clado H5N1 están genéticamente relacionados, pero no comparten el genoma vírico exacto. Existen al menos siete clados diferentes de los subtipos H5N1 designados en la técnica, por ejemplo, clado 1, clado 2, clado 3, clado 4, clado 5, clado 6 y clado 7. El clado 2 se divide adicionalmente en subclados.

La expresión "composición antigénica" se refiere a una composición que comprende material que estimula el sistema inmunitario y desencadena una respuesta inmunitaria en un hospedador o sujeto. La expresión "desencadenar una respuesta inmunitaria" se refiere a la estimulación de las células inmunitarias in vivo en respuesta a un estímulo, tal como un antígeno. La respuesta inmunitaria consiste tanto en la respuesta inmunitaria celular, por ejemplo, estimulación de linfocitos T y macrófagos, como en la respuesta inmunitaria humoral, por ejemplo, estimulación de células B y el complemento y producción de anticuerpos. La respuesta inmunitaria celular y humoral no son mutuamente excluyentes y se contempla que una o las dos sean estimuladas por una composición antigénica, virus o vacuna como se describe en el presente documento. La respuesta inmunitaria se puede medir usando técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a, inmunoensayos de anticuerpos, ensayos de

proliferación y otros descritos en mayor detalle en la Descripción detallada.

El término "atenuado" se usa para describir un virus o composición antigénica que muestra una virulencia reducida (en comparación con un virus de tipo silvestre). Una HA modificada es un gen de la HA que se ha alterado con respecto a la HA de tipo silvestre y codifica una proteína que se escinde en un menor grado que en la proteína HA de tipo silvestre, dando como resultado la disminución del crecimiento del virus. Un virus atenuado normalmente, pero no siempre, se administra por vía intranasal. La administración de un virus atenuado se contempla a través de cualquier vía descrita en el presente documento.

El término "inactivado" se usa en el presente documento para describir un virus que también se conoce en la técnica como un virus "destruido" o "muerto". Un virus inactivado es un virus entero sin propiedades virulentas y se produce a partir de un virus "vivo", independientemente de que el virus se haya atenuado previamente de cualquier manera. Un virus inactivado normalmente, pero no siempre, se administra a través de inyección intramuscular. La administración de un virus inactivado se contempla a través de cualquier vía descrita en el presente documento.

El término "vacuna" como se usa en el presente documento se refiere a una composición que comprende un virus reagrupado como se describe en el presente documento, que es útil para establecer inmunidad al virus en el sujeto. Se contempla que la vacuna comprenda un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. Se contempla que las vacunas sean profilácticas o terapéuticas. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o solamente presenta signos precoces con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos de la invención pueden proporcionarse en forma de un tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología o para minimizar la gravedad de la patología, si se desarrolla. Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas de patología con el fin de disminuir o eliminar esos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos y funcionales, subjetivos u objetivos.

Un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier porción del polipéptido más pequeña que el producto de expresión polipeptídico o proteico de longitud completa. Los fragmentos son, en un aspecto, análogos de supresión del polipéptido de longitud completa en el que uno o más restos de aminoácidos se han retirado del extremo amino y/o el extremo carboxi del polipéptido de longitud completa. En consecuencia, "fragmentos" son un subconjunto de análogos de supresión que se describen a continuación.

Un "análogo", "equivalente" o "derivado", que se usan de forma intercambiable, se refiere a un compuesto, por ejemplo, un péptido o polipéptido, sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, aunque en ciertos casos en un grado distinto, que una molécula de origen natural. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido de origen natural del que deriva el análogo, basándose en una o más mutaciones que implican (i) supresión de uno o más restos de aminoácidos en uno o más extremos del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia polipeptídica de origen natural, (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos (normalmente un análogo de "adición") del polipéptido y/o una o más regiones internas (normalmente un análogo de "inserción") de la secuencia polipeptídica de origen natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia polipeptídica de origen natural. Se contempla que un virus reagrupado de la invención comprenda un análogo de un gen vírico, incluyendo uno cualquiera o más de uno de un gen de HA, NA, PB1, PB2, PA, M (M1 y M2), NS (NS1 y NS2) y NP.

En un aspecto, un análogo presenta una similitud de secuencia de aproximadamente el 70 %, pero una similitud de secuencia inferior al 100 % con la secuencia de origen natural o de tipo silvestre, por ejemplo, un péptido. Dichos análogos o derivados, en un aspecto, están compuestos de restos de aminoácidos de origen no natural, incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación, homocisteína, ornitina, penicilamina y norvalina, así como de restos de aminoácidos de origen natural. Dichos análogos o derivados, en otro aspecto, están compuestos de uno o una pluralidad de restos de D-aminoácidos o contienen enlaces no peptídicos entre dos o más restos de aminoácidos. En una realización, el análogo o derivado puede ser un fragmento de un polipéptido, en el que el fragmento es sustancialmente homólogo (es decir, homólogo en al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %) en una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos del polipéptido de tipo silvestre.

Las sustituciones son conservadoras o no conservadoras basándose en la relación fisicoquímica o funcional del aminoácido que se está reemplazando y el aminoácido que lo reemplaza. Las sustituciones de este tipo son bien conocidas en la técnica. Como alternativa, la invención abarca sustituciones que además son no conservadoras. Se describen sustituciones conservadoras de ejemplo en Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs.71-77] y se exponen a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVADORAS **CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL AMINOÁCIDO**

C No polar (hidrófoba):

A. Alifática

A L I V P

B. Aromática	F W
C. Contiene azufre	M
D. Limítrofe	G
Sin carga polar:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Limítrofe	G
Cargada positivamente (básica)	K R H
Cargada negativamente (ácida)	D E

Como alternativa, se exponen sustituciones conservadoras de ejemplo inmediatamente a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVADORAS II
RESTO ORIGINAL SUSTITUCIÓN ILUSTRATIVA

Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

5

El término "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a un virus o composición antigénica que se retira de su entorno nativo. De este modo, un material biológico aislado está libre de algunos o de todos los componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que el material nativo se produce de forma natural (por ejemplo, componente citoplásmico o de membrana). En un aspecto, un virus o composición antigénica se considera aislado si está presente en un extracto celular o sobrenadante. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, un ARNm aislado, un ADNc o un fragmento de restricción.

10

15

El término "purificado" como se usa en el presente documento se refiere a un virus o composición antigénica que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales endógenos a partir de los cuales se obtiene la composición. A modo de ejemplo y sin limitación, un virión purificado está sustancialmente libre de componentes de la célula hospedadora o cultivo, incluyendo el cultivo de tejidos o proteínas de huevo y patógenos no específicos. En diversas realizaciones, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es puro en al menos un 50 %; al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 % puro. La pureza puede evaluarse mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica.

20

25

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para la administración a un sujeto animal, incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un virus o composición antigénica de la invención y también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica abarca una composición que comprende el ingrediente o ingredientes activos y el ingrediente o ingredientes inertes que componen el vehículo farmacéuticamente aceptable, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más de los ingredientes. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición hecha mezclando un compuesto o conjugado

30

de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones y excipientes, tales como una solución salina tamponada con fosfato, solución acuosa al 5 % de dextrosa o manitol y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Se describen vehículos y formulaciones farmacéuticos adecuados en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los vehículos farmacéuticos útiles para la composición dependen del modo de administración previsto del agente activo. Los modos típicos de administración incluyen, pero no se limitan a, enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o administración tópica, transdérmica o transmucosa). Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que puede formularse en un compuesto o conjugado para su uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales de metales (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin provocar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de manera perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido, o cuando se administra usando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación.

Genes del virus de la gripe

Los virus de la gripe son virus ARN de cadena negativa segmentados y pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. El virus de la gripe A consiste en nueve proteínas estructurales y codifica adicionalmente una proteína NS1 no estructural con funciones reguladoras. El genoma segmentado del virus de la gripe contiene ocho segmentos génicos de ARN de sentido negativo (ARNsn) (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) que codifica al menos diez polipéptidos, incluyendo proteínas ARN polimerasa dirigida por ARN (PB2, PB1 y PA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), hemaglutinina (subunidades HA1 y HA2), las proteínas de la matriz (M1 y M2) y las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) (Krug et al., *The Influenza Viruses*, R. M. Krug, ed., Plenum Press, Nueva York, 1989, págs. 89 152).

La capacidad del virus de la gripe de provocar una enfermedad generalizada se debe a su capacidad para evadir el sistema inmunitario mediante un cambio antigénico subyacente, que se cree que se produce cuando un hospedador es infectado simultáneamente tanto con un virus de la gripe animal como con un virus de la gripe humana. Durante la mutación y la reagrupación en el hospedador, el virus puede incorporar un gen de la proteína de superficie HA y/o NA de otro virus en su genoma, produciendo de este modo un nuevo subtipo de virus de la gripe y evadiendo el sistema inmunitario.

Hemaglutinina

La HA es una glucoproteína de superficie vírica que comprende aproximadamente 560 aminoácidos y representa el 25 % de la proteína vírica total. Es responsable de la adhesión de la partícula vírica a, y su penetración en, una célula hospedadora en las primeras etapas de la infección. Hay 16 subtipos de HA conocidos, categorizados como un subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

La escisión del precursor HAO de virus en los subfragmentos HA1_ y HA2 es una etapa necesaria para que el virus infecte una célula. Por tanto, se requiere la escisión con el fin de convertir nuevas partículas víricas en las células hospedadoras en viriones capaces de infectar nuevas células. Se sabe que la escisión se produce durante el transporte de la proteína de membrana integral HAO desde el retículo endoplásmico de la célula infectada a la membrana plasmática. En el curso del transporte, la hemaglutinina experimenta una serie de modificaciones cotraduccionales y postraduccionales incluyendo la escisión proteolítica de la HA precursora en el fragmento aminoterminal HA1 y el HA2 carboxiterminal. Una de las principales dificultades en el cultivo de cepas del virus de la gripe en cultivos de tejido primario o estirpes celulares establecidas surge de la necesidad de activación por escisión proteolítica de la hemaglutinina del virus de la gripe en la célula hospedadora.

Aunque se sabe que una HA no escindida puede mediar la fijación del virus a sus receptores que contienen ácido neuramínico sobre una superficie celular, no es susceptible de la siguiente etapa en el ciclo infeccioso, que es la fusión. Se ha informado de que se requiere la exposición del extremo amino hidrófobo del HA2 por escisión de manera que pueda insertarse en la célula diana, formando de este modo un puente entre el virus y la membrana de la célula diana. Este proceso va seguido de la fusión de las dos membranas y la entrada del virus en la célula diana.

La activación proteolítica de HA implica la escisión en un resto arginina por una endoproteasa similar a la tripsina, que con frecuencia es una enzima intracelular que es dependiente de calcio y cuyo pH óptimo es el neutro. Puesto que las proteasas activadoras son enzimas celulares, el tipo de célula infectada determina si la HA se escinde. Las HA de los virus de la gripe de mamíferos y de los virus de la gripe aviar no patógenos son susceptibles a la escisión

proteolítica solo en un número restringido de tipos celulares. Por otro lado, las HA de virus aviares patógenos entre los subtipos H5 y H7 se escinden por proteasas presentes en una amplia gama de células hospedadoras diferentes. Por tanto, existen diferencias en la gama de hospedadores que son resultado de las diferencias en la capacidad de escisión de la hemaglutinina que se correlacionan con las propiedades patógenas del virus.

Las diferencias en la capacidad de escisión se deben a diferencias en la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la HA. Los análisis de secuencia muestran que los fragmentos HAI₁ y HA2 de la molécula de HA de los virus de la gripe aviar no patógenos y todos los virus de la gripe de mamíferos están unidos por una sola arginina. Por el contrario, las cepas aviares patógenas tienen una secuencia de varios aminoácidos básicos en el sitio de escisión siendo el común denominador lisina-arginina o arginina-arginina, por ejemplo, RRRK (SEQ ID NO: 15). Las hemaglutininas de todos los virus de la gripe se escinden mediante el mismo mecanismo general que da como resultado la eliminación de los aminoácidos básicos.

Neuraminidasa

La neuraminidasa es una segunda glucoproteína de membrana de los virus de la gripe A. Se ha demostrado que la presencia de NA vírica es importante para generar una respuesta inmunitaria protectora de múltiples facetas frente a un virus infectante. La NA es una proteína de 413 aminoácidos codificada por un gen de 1413 nucleótidos. Se han identificado nueve subtipos de NA diferentes en los virus de la gripe (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9), todos los cuales se han descubierto entre las aves silvestres. La NA está implicada en la destrucción del receptor celular para la HA vírica mediante la escisión de restos de ácido neuramínico terminal (también denominado ácido siálico) de restos de hidrato de carbono sobre las superficies de las células infectadas. La NA también escinde restos de ácido siálico de proteínas víricas, evitando la agregación de virus. Se planteó la hipótesis de que mediante el uso de este mecanismo la NA facilita la liberación de la progenie vírica evitando que las partículas víricas recién formadas se acumulen a lo largo de la membrana celular, así como promoviendo el transporte del virus a través de la mucosa presente en la superficie mucosa. La NA es un determinante antigénico importante que está sujeto a variación antigénica.

La administración de inhibidores químicos de la neuraminidasa limita la gravedad y la propagación de las infecciones víricas. Los inhibidores de la neuraminidasa combaten la infección gripal evitando que el virus produzca gemación sobre la célula hospedador. Los inhibidores de la NA de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, zanamivir, que se administra por inhalación; oseltamivir, que se administra por vía oral; y peramivir que se administra por vía parenteral.

Genes internos del virus de la gripe

Además de las proteínas de superficie HA y NA, el virus de la gripe comprende seis genes internos adicionales, que dan lugar a ocho proteínas diferentes, incluyendo genes de polimerasa PB1, PB2 y PA, proteínas de la matriz M1 y M2, nucleoproteína (NP) y proteínas no estructurales NS1 y NS2 (Horimoto et al., *Clin Microbiol Rev.* 14 (1): 129-49, 2001).

Con el fin de que se empaquete en viriones de la progenie, el ARN vírico se transporta desde el núcleo en forma de un complejo de ribonucleoproteína compuesto de las tres proteínas polimerasas del virus de la gripe, la nucleoproteína (NP) y el ARN vírico, en asociación con la proteína de la matriz del virus de la gripe 1 (M1) y proteína de exportación nuclear (Marsh et al., *J Virol.*, 82: 2295-2304, 2008). Se cree que la proteína M1 que se encuentra dentro de la envuelta funciona en el montaje y en la gemación.

Se integra un número limitado de proteínas M2 en los viriones (Zebedee, *J. Virol.* 62: 2762-2772, 1988). Éstas forman tetrámeros que tienen actividad de canal iónico de H⁺, y, cuando son activadas por el pH bajo de los endosomas, acidifican el interior del virión, facilitando su desenvolvimiento (Pinto et al., *Cell* 69: 517-528, 1992). La amantadina es un fármaco antigripal que evita la infección vírica mediante la interferencia con la actividad de canal iónico de M2, inhibiendo de este modo el desenvolvimiento del virus.

La proteína NS1, una proteína no estructural, tiene múltiples funciones, incluyendo la regulación del corte y empalme y la exportación nuclear de ARNm celular, así como la estimulación de la traducción. La función principal de NS1 parece ser la de contrarrestar la actividad de interferón del hospedador, puesto que un virus inactivado para NS1 fue viable a pesar de que se cultivó menos eficientemente que el virus parental en células no deficientes en interferón (García-Sastre, *Virology* 252: 324-330, 1998).

La proteína NS2 se ha detectado en partículas víricas. Se estimó que el número promedio de proteínas NS2 en una partícula vírica era de 130-200 moléculas. Un ensayo de unión in vitro muestra un contacto directo proteína-proteína entre M1 y NS2. También se detectaron complejos NS2-M1 mediante inmunoprecipitación en lisados de células infectadas con virus (*Virology.* 196: 249-55, 1993). Se cree que la proteína NS2, que se sabe existe en los viriones (Richardson et al., *Arch. Virol.* 116: 69-80, 1991; Yasuda et al., *Virology* 196: 249-255, 1993), desempeña una función en la exportación de RNP desde el núcleo a través de la interacción con la proteína M1 (Ward et al., *Arch. Virol.* 140: 2067-2073, 1995).

Genética inversa y virus reagrupados

Son bien conocidas para los expertos en la materia técnicas para aislar y modificar ácidos nucleicos específicos y proteínas. De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse la biología molecular convencional, la microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (en el presente documento "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning. A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames y S. J. Higgins editores (1985)]; *Transcription And Translation* [B. D. Hames y S. J. Higgins, editores (1984)]; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; *B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); Ausubel, F. M. et al. (editores). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1994. Estas técnicas incluyen mutagénesis dirigida al sitio empleando oligonucleótidos con nucleótidos alterados para la generación de productos de PCR con mutaciones.

En un aspecto, la presente invención se basa en la generación de virus de la gripe aviar y vacunas de los mismos mediante metodologías de genética inversa como se describen en el presente documento y conocidos en la técnica.

El mecanismo de transcripción del ARN vírico del virus de la gripe es único (Horimoto et al., *Clin Microbiol Rev.* 14 (1): 129-49, 2001). El capuchón 5' de los ARNm celulares se escinde por una endonucleasa viral y se usa como un cebador para la transcripción por la transcriptasa vírica (Krug et al., *Cell* 18: 329-334, 1979). Seis de los ocho segmentos de ARN se transcriben en ARNm de una manera monocistrónica y se traducen en HA, NA, NP, PB1, PB2 y PA. Por el contrario, dos segmentos de ARN se transcriben cada uno a dos ARNm mediante corte y empalme. Para los dos genes de M y NS, los ARNm de codificación se traducen en diferentes marcos de lectura, generando proteínas M1 y M2 y proteínas NS1 y NS2, respectivamente. Se cree que el aumento de la concentración de NP libre desencadena el cambio de la síntesis de ARNm a la síntesis de ARN complementario (ARNc) y ARN vírico (ARNv) (Shapiro et al., *J. Virol.* 62: 2285-2290, 1988). Los ARNv recién sintetizados se encapsidan con NP en el núcleo, donde actúan como moldes para la transcripción secundaria de ARNm víricos.

Sistemas de genética inversa desarrollados recientemente han permitido la manipulación del genoma vírico del virus de la gripe (Palese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11354-58, 1996; Neumann y Kawaoka, *Adv. Virus. Res.* 53: 265, 1999; Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9345, 1999; Fodor et al., *J. Virol.* 73: 9679, 1999). La genética inversa en el contexto del virus de la gripe es un mecanismo mediante el cual ARN de sentido negativo se transforma mediante ingeniería genética en ADNc para la preparación recombinante de organismos que tienen genomas de ARN de cadena negativa. La técnica de genética inversa implica la preparación de ARN víricos recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del virus de cadena negativa esenciales para el reconocimiento del ARN vírico por las polimerasas víricas y para empaquetar señales necesarias para generar un virión maduro. Los ARN recombinantes se sintetizan a partir de un molde de ADN recombinante y se reconstituyen in vitro con complejo de polimerasa vírico purificado para formar ribonucleoproteínas recombinantes (RNP) que pueden usarse para transfectar células. Véanse las Patentes de los EE.UU. 6.022.726 y 6.001.634.

Estos métodos recombinantes permiten la producción de tipos de virus de la gripe con alteraciones específicas en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, una molécula de HA que contiene una sustitución deseada puede ser parte de un virus de la gripe recombinante. En un método, el virus de la gripe recombinante se hace a través de un método de ingeniería genética tal como el sistema de "solo plásmido" (Hoffmann et al., *Vaccine* 20: 3165, 2002).

En otro método para generar un virus recombinante, se usa un sistema de ocho plásmidos, en el que los ARN de sentido negativo se expresan a partir de un promotor pol I y la coexpresión de las proteínas del complejo de polimerasa da como resultado la formación de virus de la gripe A infecciosos (Hoffmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6108-13, 2000). Esta tecnología permite la producción rápida de vacunas químicas a partir de ADNc para su uso en el caso de una pandemia de gripe y proporciona la capacidad de atenuar cepas patógenas (Subbarao et al., *Virology* 305: 192-200, 2003), al tiempo que elimina la necesidad de seleccionar virus reagrupados para la configuración 6:2 (es decir, 6 genes internos y 2 genes de la HA y de la NA (uno de cada gen)). Véase también la Patente de los EE.UU. 7.037.707.

En una realización, en el caso de los virus de la gripe altamente patógenos tales como H5N1, el sitio de escisión polibásico de la HA que es responsable de la naturaleza altamente patógena del virus se retira por mutagénesis dirigida al sitio para atenuar el virus y para cambiar su clasificación de BSL-3 a BSL-2. Además, uno o más de los genes internos de la cepa donante prototipo se reemplazan por los genes de virus de otros subtipos para mejorar adicionalmente las características de crecimiento.

Un virus de este tipo que combina características de alto crecimiento con las ventajas inmunitarias de un virus de tipo silvestre H5N1 ahorra tiempo para la producción y, en un aspecto, es un reagrupado 6:2 que tiene los 6 genes internos de un virus H5N1 tal como Vietnam o Indonesia como estructura principal y la HA (con el sitio de escisión mutado para la atenuación) y la NA de la cepa (de tipo) H5N1 pandémica real. Otro ejemplo de un virus reagrupado

que tiene un alto potencial de crecimiento es un reagrupado 5:1:2 con 5 genes internos de los virus H5N1 tales como Vietnam o Indonesia, la PB2 de una cepa H1N1 (para el crecimiento mejorado en cultivo celular) como estructura principal y la HA (con un sitio de escisión mutado para la atenuación) y la NA de la cepa H5N1 pandémica real.

- 5 En algunas realizaciones, los virus reagrupados se preparan usando el método de Palese et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11354-58, 1996), que describe el uso de un sistema de virus auxiliar para generar virus modificado por ingeniería genética. En una realización, el virus se genera usando un método de virus auxiliar del virus de la gripe. Por ejemplo, para la construcción de un reagrupado 6:2, el virus VN1203 atenuado podría usarse como un virus auxiliar para introducir la HA y la NA de una segunda cepa H5N1, tal como la cepa Egipto de pollo (Aly et al., *Avian Dis.* 52: 26977, 2008). La selección del virus transfectante se realiza usando anticuerpos neutralizantes contra las proteínas auxiliares HA o NA (véase, por ejemplo, la Figura 2 de Palese et al., citado anteriormente).

Dos reagrupados de H5N1 atenuados de ejemplo descritos en el presente documento tienen la estructura principal de la cepa H5N1 clado 1 A/Vietnam/1203/2004, es decir, los seis genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M, NS); uno contiene la HA y la NA mutadas de la cepa H5N1 clado 1 Vietnam 1203 y la HA y la NA mutadas de un virus H5N1 de un clado diferente, por ejemplo, la cepa de clado 2 A/Indonesia/5/05. Estos dos reagrupados RG atenuados tienen un potencial de alto crecimiento en células Vero convencionales (que contienen suero bovino fetal) o células Vero sin proteínas séricas. Estos virus reagrupados también tienen el potencial de inducir una respuesta inmunitaria específica de H5N1 potenciada en comparación con los reagrupados RG H5N1/PR8 existentes ya que contienen todas las proteínas de H5N1, a saber, la nucleoproteína y la proteína de matriz que son principalmente responsables de la inducción de la inmunidad celular. Estas respuestas inmunitarias celulares específicas de H5N1 también pueden tener la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria más amplia mediante la inducción específica de linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos (LTC) y células de memoria dando como resultado un efecto de refuerzo mejorado. Este resultado no es el caso con los reagrupados H5N1/PR8 existentes que tienen las proteínas internas derivadas de la cepa estacional adaptada a huevo del subtipo H1N1, que no inducen una respuesta inmunitaria celular específica de H5N1 fuerte.

Se han identificado numerosas cepas H5N1 en la técnica, cada una de las cuales es responsable de la invención. Véase, por ejemplo, Govorkova et al., *J Virol.* Febrero de 2005; 79 (4): 2191-8; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2845-50, 2006; Horimoto et al., *Clin Microbiol Rev* 14: 129-49, 2001 y Cauthen et al., *J Virol.* 74: 6592-9, 2000, entre otros (véase, por ejemplo, Lee et al., *J Virol* 79: 369202, 2005).

Los ejemplos de cepas del virus de la gripe H5N1 aviar que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (N.º del CDC 2004706280) (VN1203), A/Indonesia/05/2005 (H5N1) (N.º del CDC 2005740199) (IN5/05), A/Camboya/R0405050/2007 (H5N1) (CamR04), A/Anhui/1/05 (H5N1) (AH1/05), A/Pavo/Turquía/01/2005 (H5N1) (TT01) (véase, por ejemplo, Carter y col, *BioDrugs.* 22: 279-92, 2008), A/Vietnam/1194/2004, cepa del virus de la gripe del pavo A/Turquía/Inglaterra/50-92/91 (H5N1) (véase, por ejemplo, Horimoto et al., *Clin Microbiol Rev* 14: 129-49, 2001), A/Pavo/Inglaterra/8792BFC/91 (H5N1) (Londt et al., *Avian Pathology.*, 36: 347 - 350, 2007), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Indonesia/03 (H5N1), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Hong Kong/220/97 (véase, por ejemplo, Tumpey et al., *J Virol.* 76: 6344-55, 2002), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Escocia/59 (H5N1) (véase, por ejemplo, Horimoto et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Hong Kong/258/97 (H5N1) (véase, por ejemplo, Horimoto et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Nakom-Patom/Tailandia/CU-K2/2004 (H5N1) (véase, por ejemplo, Anwar et al., *In Silico Biol.* 6: 161-8, 2006; Viseshakul et al., *Virology.* 328: 169-76, 2004), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Hong Kong/31.2/2002 (H5N1), (véase, por ejemplo, Anwar et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Vietnam/C58/04 (H5N1), (véase, por ejemplo, Anwar et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Vietnam/38/2004 (H5N1). (ver, por ejemplo, Anwar et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Hong Kong/1000/97 (H5N1) (véase, por ejemplo, Shan et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 302: 377-83, 2003), cepa del virus de la gripe del pollo A/Pollo/Hong Kong/317.5/01 y cepa del virus de la gripe del pato A/Pato/Anyang/AVL-1/01 (véase, por ejemplo, Tumpey et al., *J. Virol* 76: 6344-55, 2002), cepa del virus de la gripe del pato A/Pato/Vietnam/11/2004 (H5N1), A/Hatay/2004/(H5N1) (véase, por ejemplo, Anwar et al., citado anteriormente), cepas del virus de la gripe del pato A/Pato/Corea/ES/03 (H5N1), A/Pato/Corea/ESD1/03 (H5N1) y A/Pato/Hong Kong/821/02 (H5N1) (véase, por ejemplo, Lee et al., *J Virol* 79: 3692-02, 2005), cepa del virus de la gripe del pato A/Pato/Vietnam/11/2004 (H5N1), A/Pato/China/E319-2/03 (véase Lee et al., *Vet Microbiol* 124: 193-201, 2007), virus de la gripe de la garza A/garza/Hong Kong/757.2/02 (H5N1) (véase, por ejemplo, Lee et al., *J Virol.* 79: 3692-02, 2005), cepa del virus de la gripe del ganso A/Ganso/Guangdong/1/96 (véase, por ejemplo, Cauthen et al., *J Virol.* 74: 6592-9, 2000), cepa del virus de la gripe aviar A/Env/HK/437-4/99 (véase, por ejemplo, Cauthen et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe aviar A/Env/HK/437-6/99 (véase, por ejemplo, Cauthen et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe aviar A/Env/HK/437-8/99 (véase, por ejemplo, Cauthen et al., citado anteriormente), cepa de virus de la gripe aviar A/Env/HK/437-10/99, (véase, por ejemplo, Cauthen et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe aviar A/Codorniz/Vietnam/36/04 (H5N1). (véase, por ejemplo, Anwar et al., citado anteriormente), cepa del virus de la gripe aviar A/Cisne/Italia/179/06 (H5N1) (véase, por ejemplo, Terregino et al., *Vet Rec.* 158: 491, 2006), cepa del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/156/97 (H5N1) (HK156) (véase, por ejemplo, Cauthen et al., citado anteriormente) y cepa del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/213/03 (H5N1) (HK213) (véase, por ejemplo, Shinya et al., *J. Virol.* 79: 9926-32, 2005), así como los desvelados en Lee et al., *Emerging Infect Dis.* 14: 487-90, 2008.

Con el conocimiento de genes internos y genes de la HA y de la NA de cepas H5N1, se apreciará que, en una realización alternativa, se sintetizan polinucleótidos que codifican estos genes mediante técnicas bien conocidas y practicadas habitualmente en la técnica.

- 5 Se han identificados anteriormente virus de la gripe A de los siguientes subtipos, H1N1, H2N2, H1N2, H3N2, H3N8, H4N6, H5N1, H5N2, H5N3, H5N9, H6N1, H6N2, H6N5, H7N1, H7N7, H8N4, H9N2, H10N7, H11N6, H12N5, H13N6, H14N5, H15N8, H15N9, H16N3. La Tabla 1 enumera genes de la HA y de la NA de cepas del virus de la gripe A de ejemplo útiles para generar un virus reagrupado.

10

TABLA 1

Subtipo génico	No. de Acceso	Genes de la hemaglutinina
H1	NC_002017	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)), secuencia completa
H1	FJ966952	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/California/05/2009 (H1N1)), secuencia codificante completa
H2	L20410	Gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/Singapur/1/1957 (H2N2)), secuencia codificante completa
H2	L11126	Gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/Berlín/3/64 (H2N2)), secuencia codificante completa
H3	CY050836	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/Nueva York/3487/2009 (H3N2)), secuencia completa
H3	CY006628	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/Canterbury/257/2005 (H3N2)), secuencia completa
H4	M25290	Gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/Pavo/Minnesota/833/1980 (H4N2)), secuencia codificante completa
H4	FJ428583	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/Pato real/Lago Poyan/15/2007 (H4H6)), secuencia codificante completa
H5	EF541403	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)), secuencia codificante completa
H5	AF082035	ARNm de la hemaglutinina H5 del virus de la gripe A (A/Pollo/Hong Kong/786/97 (H5N1)), secuencia codificante completa
H6	GO117282	Gen de la hemaglutinina {HA} del segmento 4 del virus de la gripe A (A/gaviota de Delaware/GA/121733/2001 (H6N4)), secuencia codificante completa
H6	CY045343	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/Pato cuchara/California/K138/2005 (H6N2)), secuencia completa.
H7	EF576989	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/pato/AB/AFLBs8734C16/2007 (H7)), secuencia completa,
H7	AY240925	Gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/aviar/NY/73063-6/00 (H7N2)), secuencia codificante completa
H8	CY043848	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/pato real/Países Bajos/1/2006 (H8N4)), secuencia completa
H8	AB450435	Gen de la HA del virus de la gripe A (A/pato/Alaska/702/1991 (H8N7)) para hemaglutinina, secuencia codificante completa.
H9	GU071984	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/pollo/Irán/THLBM868/2007 (H9N2)), secuencia codificante completa
H9	CY023992	Secuencia del segmento 4 del virus de la gripe A (A/pato/Shantou/3577/2003 (H9N2)).
H10	EU124207	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/Pato/Indonesia/Yakarta Utara1 631-29/2006 (H10)), secuencia codificante completa
H10	M21647	Gen, precursor de la hemaglutinina del virus de la gripe A (A/pollo/Alemania/N/1949 (H10N7)), secuencia codificante completa
H11	CY021437	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/medio ambiente/Delaware/235/2005 (H11N6)), secuencia completa.
H11	D90306	Gen del virus de la gripe A (A/pato/Inglaterra/1/1956H11N6)) para precursor de hemaglutinina, secuencia codificante completa
H12	CY021877	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/pato real/Maryland/1131/20054/H12N5)), secuencia completa
H12	AB283334	Gen de la HA del virus de la gripe A (A/pato/Alberta/60/1976 (H12N5)) para hemaglutinina, secuencia codificante completa.
H13	EU835900	Gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/gaviota/Astrakán/1818/1998 (H13N6)), secuencia codificante completa

H13	AB292664	Gen de la HA del virus de la gripe A (A/gaviota/Maryland-704/1 977 (H13N6)) para hemaglutinina, secuencia codificante completa
H14	FJ975075	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/gaviota de Delaware/Astrakán/267/1982 (H14N5)), secuencia codificante completa
H14	AM922165	Gen parcial de la HA del virus de la gripe A (A/pato real/Gur/263/82 (H14N3)) para hemaglutinina, ARN genómico.
H15	L43917	ARNm de la hemaglutinina del virus de la gripe A (A/pardela/Wes/Australia/2576/79 (H15N9)), secuencia codificante completa
H15	CY006032	Segmento 4 del virus de la gripe A (A/tarro australiano/Australia occidental/1756/1983 (H15N2)), secuencia completa.
H16	EU148600	Gen del precursor de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/Pato real/Gurjev/785/83 (H16N3)) secuencia codificante completa
H16	EU564109	Gen de la hemaglutinina (HA) del segmento 4 del virus de la gripe A (A/Focha común/Volga/635), secuencia codificante completa
		Genes de la neuraminidasa
N1	FJ969517	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/California/O4/2009 (H1N1)), secuencia codificante completa
N1	CYCG0233	Secuencia del segmento 6 del virus de la gripe A (A/Brisbane/58/2007 (H1N1)).
N2	EU199420	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/Brisbane/10/2007 (H3N2)), secuencia codificante completa
N2	GU05277	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pavo/Inglaterra 1969) (H3N2)), secuencia codificante completa
N3	GU052285	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/foca/Massachusetts/39/1/1992 (H3N3)), secuencia codificante completa
N3	GU052831	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/medio ambiente/California/508249/2007 (H5N3)), secuencia codificante completa
N4	CYD39550	Secuencia del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pato cuchara/California/AKS273/2007 (H8N4)).
N4	EU557563	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/ánade rabudo/Alaska/44204-158/2006 (H5N4)), secuencia codificante completa
N5	EUB71915	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pato real/MN/105/2000 (H5N5)), secuencia codificante completa
N5	CYC33334	Secuencia del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pato cuchara/California/HKYYF1046/2007/(H3N5))
N6	GU051165	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/vuelvepedras rojizo/Nueva Jersey/950/2005 (H3N5)), secuencia codificante completa
N6	GU053454	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pato real/Chic/684/2002 (H4N6)), secuencia codificante completa
N7	FJ517261	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pardela/DE/134/2001 (H5N7)), secuencia codificante completa
N7	GL051509	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/pato real/Minnesota/17/1999 (H7N7)), secuencia codificante completa
Na	CYD15D91	Segmento 6 del virus de la gripe A (A/pavo/Irlanda/1378/1963 (H5N6)), secuencia completa.
N8	CYD43B10	Segmento 6 del virus de la gripe A (A/porrón acollarado/California/K90/2005 (H6N5)), secuencia completa.
N9	Ab29297B2	Gen de la NA del virus de la gripe A (A/pato/Hong Kong/562/1979 (H10N9N)) para la neuraminidasa, secuencia codificante completa.
N9	GU053360	Gen de la neuraminidasa (NA) del segmento 6 del virus de la gripe A (A/foca de anillos azules/Ohic/457/2001 (H11N9)), secuencia codificante completa

Los virus de la gripe A y B desvelados incluyen, pero no se limitan a, A/Brisbane/59/2007 (H1N1), a/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Islas Salomón/3/2006 (H1N1), A/Uruguay/716/2007; A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/California/7/2004 (H3N2); A/Nueva York/55/2004; A/Wellington/1/2004 (H3N2), A/Fujian/411/2002 (H3N2), A/Moscú/10/99 (H3N2), A/Panamá/2007/99; A/Sidney/5/97 (H3N2), A/Pekín/262/95 (H1N1), B/Florida/4/2006; B/Malasia/2506/2004, B/Shanghái/361/2002; B/Sichuan/379/99; B/Hong Kong/330/2001; B/Guangdong/120/2000; B/Johannesburgo/5/99; B/Victoria/504/2000; B/Sichuan/379/99; B/Pekín/184/93; B/Yamanashi/166/98; B/Shangdong/7/97; B/Harbin/7/94, B/Hawái/10/2001 y virus que tienen propiedades similares a cualquiera de los virus anteriores. La Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 20090010962 describe los virus de

la gripe A H1N1.

Una lista de cepas de la gripe A identificadas, incluyendo cepas H5N1 del virus de la gripe A, está disponible de las bases de datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) del virus de la gripe A y los subtipos H5N1. La base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EE.UU. (NCBI, por siglas en inglés) mantenida por la Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. también mantiene una base de datos actualizada que describe la longitud y la secuencia de los genes de la HA y de la NA de virus identificados de especies de la gripe A y la gripe B. Se contemplan para su uso en la invención cepas enumeradas por estas organizaciones y cepas víricas descritas en otras bases de datos comerciales y académicas, o en las publicaciones de la bibliografía y conocidas en la técnica. También se contempla que son útiles en la invención cepas adicionales de gripe A y gripe B aisladas e identificadas en lo sucesivo en el presente documento. En consecuencia, cualquier cepa H5N1 ejemplificada específicamente en la memoria descriptiva y aquellas conocidas o después descubiertas en la técnica son responsables del virus reagrupado, composición antigénica, vacuna y métodos de la invención.

Destacando la novedad de la invención y la diferenciación de la invención de virus reagrupados desvelados anteriormente en la técnica, se excluyen específicamente de la presente invención cualesquier virus (virus de la gripe A y virus de la gripe B) desvelados o producidos anteriormente, por ejemplo, usando estructuras principales tales como A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) y B/Ann Arbor/1/66, que tienen genes internos de una cepa y los genes de la HA y de la NA de una cepa diferente del mismo subtipo, en cualesquiera publicaciones anteriores referenciadas en el presente documento, incluyendo, pero no limitadas a: Patentes de los EE.UU. 4.552.758, 7.037.707, 7.601.356, 7.566.458, 7.527.800, 7.510.719, 7.504.109, 7.465.456, 7.459.162; Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 20090297554, 20090246225, 20090208527, 20090175909, 20090175908, 20090175907, 20090136530, 20080069821, 20070172929; 20080057081, 20060252132, 20060153872, 20060110406, 20050158342, 20050042229 y Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 2008/157583, WO 2008/021959, WO 2007/048089, WO 2006/098901, WO 2006/063053, WO 2006/041819, WO 2005/116260, WO 2005/116258, WO 2005/115448, WO 2005/062820, WO 2003/091401 y cualesquier virus identificados en las mismas como útiles para la vacuna FLUMIST™, que puede contener genes internos de un virus de la gripe subtipo A y genes de la HA y de la NA del mismo subtipo en un virus recombinante.

En una realización, la presente invención también excluye virus reagrupados de origen natural que comprenden una estructura principal de una primera cepa de un subtipo del virus de la gripe y genes de la HA y de la NA de una segunda cepa del mismo subtipo del virus de la gripe. La expresión "virus reagrupado de origen natural" como se usa en el presente documento se refiere a un virus reagrupado que se recombina en un entorno natural sin la intervención de una fuente externa.

En una realización adicional, la invención excluye virus reagrupados que tengan una o más genes internos modificados de un primer subtipo de virus de la gripe A o B como estructura principal, por ejemplo, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) o B/Ann Arbor/1/66 mutantes y genes de la HA y de la NA de la misma cepa de virus de la gripe, por ejemplo, como se ejemplifica en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 20070172929. La invención contempla, sin embargo, que un virus que comprende genes internos modificados de la cepa de estructura principal de un subtipo del virus de la gripe y genes de la HA y de la NA del mismo subtipo, pero diferentes cepas, se incluyan dentro del alcance de la invención.

En otra realización más, la invención excluye virus reagrupados generados usando virus adaptados al frío como cepa de estructura principal/donante, por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/Leningrado/134/17/57 (H2N2), B/Ann Arbor/1/66 y otros conocidos en la técnica, en los que los genes de estructura principal internos son de un primer subtipo y los genes de la HA y de la NA son de una cepa diferente del mismo subtipo.

Estirpes celulares

Los virus de la gripe normales están adaptados para el crecimiento en huevos de gallina, pero el coste del mantenimiento de los cultivos en huevo es significativamente mayor que el de hacer crecer virus en cultivo celular. Se han utilizado cultivos de células embrionarias de pollo (CEC, por sus siglas en inglés) convencionales en intentos de hacer crecer virus de la gripe para la vacuna, pero éstos solo proporcionan algunas de las actividades de proteasa de un embrión de pollo entero y, por tanto, permiten la replicación de una gama limitada de cepas del virus de la gripe. Los procedimientos convencionales para la preparación de cultivos de CEC implican la retirada de la cabeza y los órganos internos y múltiples etapas de tripsinización. Estos procedimientos dan como resultado específicamente la pérdida de células de cerebro, corazón, pulmón, hígado y riñón, que se ha demostrado que replican una serie de cepas del virus de la gripe (Scholtissek et al., *J. Gen. Virol.*, 69: 2155-2164, 1988). Por tanto, los procedimientos convencionales dan como resultado una población celular muy seleccionada que consiste principalmente en fibroblastos, que están limitados en términos de las cepas de virus que pueden sopostar.

Se han intentado mejoras en la producción de virus de la gripe tanto en cultivos de pollo como en estirpes celulares de mamíferos. Por ejemplo, se ha notificado que la replicación limitada de varias cepas del virus de la gripe A en cultivos celulares convencionales podría mejorarse mediante la adición de tripsina al medio de cultivo tisular. Por

ejemplo, la adición de tripsina aumenta significativamente la infectividad de diversas cepas cultivadas en cultivos de CEC (Lazarowitz et al., *Virology*, 68: 440-454, 1975). Además, Stieneke-Grober et al., (*EMBO J.*, 11: 2407-2414, 1992), han identificado la enzima activadora de HA en células MDBK como una proteasa similar a furina. Dichas enzimas se han aislado de tejidos humanos y de ratón y constituyen una nueva familia de endoproteasas eucarióticas similares a subtilisina. Katz et al., (*J. Infect Dis.* 160: 191-98, 1989) compararon las características de crecimiento del virus de la gripe H3N2 en células MDCK y cavidad amniótica de huevos embrionados y demostraron que el título del virus de la gripe obtenido de células MDCK era comparable al de los huevos embrionados y que el virus cultivado en MDCK produjo una antigenicidad aumentada in vivo. Existen problemas con el uso de las células MDCK, sin embargo. Por ejemplo, las células MDCK no son una estirpe celular con licencia para la producción de vacunas humanas y el procedimiento requiere que los virus se multipliquen y se hagan pases en serie de los mismos en la estirpe celular MDCK.

Se describen células Vero adaptadas para mejorar el cultivo vírico y la producción de vacunas en la Patente de los EE.UU. 6.146.873 y en Kistner et al., (*Vaccine* 16: 960-8, 1998), incorporado en el presente documento por referencia. Las células Vero son una estirpe celular aceptada para la producción de vacunas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. En una realización, los virus de la presente invención se cultivan en células Vero como se describe en los Ejemplos a continuación.

Estirpes celulares de mamíferos adicionales son útiles para el cultivo y crecimiento de virus. Las células de mamífero de ejemplo útiles para cultivar virus para la preparación de vacunas incluyen, pero no se limitan a: MRC-5, MRC-9, Lederle 130, hígado Chang y WI-38 (fibroblasto humano); U937 (monocito humano); Vero y CV-1 (mono verde africano); IMR-90 y IMR-91 (fibroblasto de pulmón humano que tiene características de músculo liso), MDCK (riñón canino Madin Darby), MDBK (riñón bovino Madin Darby), HEK (riñón embrionario humano), H9, CEM y HUT78 (linfocito T humano) que expresa CD4: PerC6 (retinoblasto humano); células BHK-21 (riñón de cría de hámster), BSC (célula de riñón de mono) y LLC-MK2 (riñón de mono).

Vacunas

Se contempla que una cepa de virus deseada obtenida de la preparación de cultivo tisular se use para producir una vacuna. Se conocen muchos tipos de vacunas víricas, incluyendo, pero no limitadas a, vacunas atenuadas, inactivadas, de subunidades y fraccionadas.

Las vacunas atenuadas son vacunas de virus vivos que se han alterado de alguna manera para reducir la acción patógena y ya no provocan enfermedad. Los virus atenuados se producen de varias maneras, incluyendo el crecimiento en cultivo tisular para generaciones repetidas y la manipulación genética para mutar o retirar genes implicados en la acción patógena. Por ejemplo, en una realización, los genes y/o proteínas víricas identificados como implicados en la acción patógena o implicados en la manifestación de la enfermedad, se mutan o se cambian de manera que el virus aún sea capaz de infectar y replicarse dentro de una célula, pero no pueda provocar la enfermedad. Un ejemplo de esto es mutagenizar el sitio de escisión de HA1/HA2. La atenuación de virus también ha resultado satisfactoria mediante la inserción de un epítipo extraño en un segmento génico vírico, por ejemplo, el gen de la NA (*J Virol.* 66: 4647-4653, 1992), interfiriendo de este modo con la función normal del genoma. Los virus también se atenúan usando métodos de adaptación al frío bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maassab et al., *Rev Med Virol.* 9: 237-44, 1999, que analiza métodos para atenuar virus de la gripe de tipo A y de tipo B y Ghendon et al., (*Vaccine.* 23: 4678-84, 2005), que describen un virus de la gripe adaptado al frío que se cultiva en células MDCK.

Los métodos adicionales para atenuar un virus incluyen la construcción de un virus reagrupado que carezca del gen NS1. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 6.468.544, 6.573.079, 6.669.943 y 6.866.853 y las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 20030157131 y 20040109877, que desvelan un virus atenuado que carece de un gen NS1 funcional. El gen NS1 puede suprimirse completamente o suprimirse parcialmente o alterarse mediante mutación de manera que no haya expresión funcional del gen NS1 en el virus. Las partículas víricas que carecen del gen NS1 muestran un fenotipo atenuado en comparación con virus de tipo silvestre.

Después de la producción del virus atenuado, la vacuna se prepara usando métodos convencionales. El virus se purifica usando métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, (ultra) centrifugación de alta velocidad o gradientes de sacarosa.

Las vacunas de subunidades son vacunas inactivadas. La producción de vacunas de subunidades implica el aislamiento de una porción del virus que activa el sistema inmunitario. En el caso del virus de la gripe, se han preparado vacunas de subunidades usando HA y NA purificadas, pero se usa cualquier mezcla de proteínas víricas para producir una vacuna de subunidades. Generalmente, la proteína vírica, tal como HA se extrae de formas de virus recombinantes y la vacuna de subunidades se formula para que contenga una mezcla de estas proteínas víricas de diferentes cepas.

Las vacunas fraccionadas son vacunas inactivadas producidas mediante el tratamiento de un virus envuelto con un detergente para solubilizar las proteínas de la envuelta. En el caso del virus de la gripe, se solubilizan HA y NA. En

una realización, se usan detergentes no iónicos para la producción de vacunas fraccionadas. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero no se limitan a, Nonanoil-N-Metilfucamida (Mega 9), Tritón X-100, Octilglucósido, Digitonina, C12E8, Lubrol, Nonidet P-40 y Tween (por ejemplo, Tween 20, 80 o 120).

- 5 Se preparan vacunas víricas inactivadas mediante la inactivación del virus recogido y formulándolo usando métodos conocidos para su uso como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. La inactivación se realiza usando agentes que incluyen, pero no se limitan a formaldehído, irradiación UV, glutaraldehído, etilenimina binaria (BEI) y betapropiolactona. Los agentes de inactivación se usan a una concentración lo suficientemente alta para inactivar sustancialmente todas las partículas víricas de la solución. A modo de ejemplo y sin limitación, la
- 10 inactivación de virus con irradiación gamma se describe en la Patente de los EE.UU. 6.254.873; la inactivación con formol se describe en la Patente de los EE.UU. 6.254.873 y la Patente de los EE.UU. 6.635.246; la inactivación con formaldehído se describe para JE-VAX®, vacuna del virus de la encefalitis japonesa en Couch et al., *J Infect Dis* 1997; 176 (Supl. 1): 538-44; la inactivación fotodinámica por luz visible se describe en Wallis, et al., *Journal of Immunology*, 1963, 91: 677-682; la inactivación con luz UV se describe en el documento WO/2008/039494; la
- 15 inactivación por cloro se describe en Rice EW, et al., *Emerg Infect Dis* [serie en Internet]. Octubre de 2007; la inactivación con policaciones hidrófobos insolubles en agua, por ejemplo, N,N-dodecil metil-polietilenimina (PEI), pintados sobre superficies se describe en Halder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 103: 17667-17671, 2006; la inactivación térmica se describe en Thomas et al., *Journal of Food Protection*. 70: 674-680; la inactivación con betapropiolactona (como se usa para la producción de Inflexal V y Fluvirina) se describe en la FARMACOPEA
- 20 EUROPEA 5.0; la inactivación por etilenimina binaria se describe en la Patente de los EE.UU. 6.803.041. Se contempla que, durante la etapa de inactivación, la purificación de las subunidades y/o el fraccionamiento se realizan antes o después de la purificación del virus a partir del cultivo celular. Por ejemplo, la producción de una vacuna de virus inactivado puede implicar la retirada de material celular, la inactivación de virus, la purificación y la solubilización de la envuelta vírica. En una realización, un virus reagrupado descrito en el presente documento se cultiva y se aísla a partir de células Vero como se describe en Kistner et al., *Vaccinas*. 25: 6028-36, 2007.

Después se prepara una vacuna usando adyuvantes convencionales y preparaciones de vacuna conocidas en la técnica. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, saponina, detergentes no iónicos, aceite vegetal, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluriónicos,

30 polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianinas de lapa californiana y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina, BCG (bacilo de Calmette-Guerin) *Corynebacterium parvum*, ISCOM, nano-perlas, escualeno y copolímeros de bloque, que se contemplan para su uso solos o en combinación.

ISCOM es un acrónimo de Complejo Estimulante Inmunitario (por sus siglas en inglés), descrito inicialmente en Morein et al. (*Nature* 308: 457-460,1984). Los ISCOM son un sistema novedoso de entrega de vacunas y son distintos de los adyuvantes convencionales. Un ISCOM se forma de dos maneras. En algunas realizaciones, el antígeno se incorpora físicamente en la estructura durante su formulación. En otras realizaciones, una matriz de

40 ISCOM (como se suministra por, por ejemplo, Isconova) no contiene antígeno, sino que se mezcla con el antígeno de elección por el usuario final antes de la inmunización. Después de la mezcla, los antígenos están presentes en solución con la matriz de ISCOM, pero no se incorporan físicamente en la estructura.

En una realización, el adyuvante es una emulsión de aceite en agua. Las emulsiones de aceite en agua son bien conocidas en la técnica y se ha sugerido que son útiles como composiciones adyuvantes (documento EP 399843; documento WO 95/17210, Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 20080014217). En una realización, el aceite metabolizable está presente en una cantidad del 0,5 % al 20 % (concentración final) del volumen total de la composición antigénica o virus aislado, en una cantidad del 1,0 % al 10 % del volumen total o en una cantidad del

50 2,0 % al 6,0 % del volumen total.

En algunas realizaciones, los sistemas de emulsión de aceite en agua útiles como adyuvante tienen un tamaño de las gotitas de aceite pequeño. En ciertas realizaciones, los tamaños de las gotitas estarán en el intervalo de 120 a 750 nm o de 120 nm a 600 nm de diámetro.

Con el fin de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para la administración humana, la fase de aceite del sistema de emulsión comprende un aceite metabolizable. El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y sea susceptible de ser transformado por el metabolismo. Nueces, semillas y granos son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos son también parte de la presente invención y pueden incluir aceites disponibles en el mercado

60 tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es el escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón y en cantidades inferiores en el oliva aceite, el aceite de germen de trigo, el aceite de salvado de arroz y la levadura y es un aceite particularmente adecuado para su uso en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice Merck, décima edición, entrada n.º 8619). Los aceites de ejemplo útiles para una emulsión de aceite en agua incluyen, pero no se limitan a, esteroides, tocoles y alfa-tocoferol.

En realizaciones adicionales, se añaden estimulantes del sistema inmunitario a la vacuna y/o composición farmacéutica. Los estimulantes inmunitarios incluyen: citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, sobrenadantes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos o células de órganos linfoides, preparaciones celulares y/o extractos vegetales, preparaciones celulares y/o extractos de bacterias (por ejemplo, BCG, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*), parásitos o mitógenos y ácidos nucleicos novedosos derivados de otros virus u otras fuentes (por ejemplo, ARN bicatenario, CpG), copolímeros de bloque, nano-perlas u otros compuestos conocidos en la técnica, utilizados solos o en combinación.

Los ejemplos particulares de adyuvantes y otros estimulantes inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, lisolecitina; glucósidos (por ejemplo, saponina y derivados de saponina tales como Quil A (QS7 y QS21) o GPI-0100); tensioactivos catiónicos (por ejemplo, PDD); halogenuros de amonio de hidrocarburo cuaternario; polioles plurónicos; polianiones y iones poliatómicos; ácidos poliacrílicos, polímeros de bloque no iónicos (por ejemplo, Pluronic F-127); y 3D-MPL (monofosforil lípido A 3 des-O-acilado). Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 20080187546 y 20080014217.

Immunoensayos

Se conocen diversas técnicas en la materia para detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo a un antígeno, que son útiles para detectar la antigenicidad y la inducción de una respuesta inmunitaria de un virus reagrupado, composición antigénica o vacuna de la presente invención. Un método precoz de detección de la interacción entre un antígeno y un anticuerpo implica la detección y el análisis del complejo mediante precipitación en geles. Un método adicional de detección de un par de unión antígeno-anticuerpo incluye el uso de anticuerpos detectores radioyodados o una proteína radioyodada que sea reactiva con IgG, tal como la proteína A. Estos métodos precoces son bien conocidos para los expertos en la materia, tal como se revisa en *Métodos in Enzymology* 70: 166 198, 1980.

Se usan ampliamente ensayos serológicos en la determinación de diagnóstico de la gripe, así como en estudios de investigación con respecto a la epidemiología y la antigenicidad de cepas víricas. En particular, se usa ampliamente el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI o HAI) (Meisner et al., *J Virol.* 82: 5079-83, 2008; Couch et al., *Vaccine.* 25: 7656-63, 2007). El ensayo de HI también es útil para demostrar la antigenicidad de la molécula de HA modificada y ayudar en la caracterización de la proteína HA modificada como más o menos antigénica que una proteína HA no modificada.

El ensayo de HI determina la capacidad de los anticuerpos de una muestra de suero para unirse con una referencia normalizada. En el ensayo de HI, se mezclan diluciones en serie (títulos) de muestra de suero con cantidades patrón de eritrocitos y su asociación en complejos se detecta visualmente. El nivel más bajo de suero titulado que da como resultado un complejo visible es el resultado del ensayo.

Un ensayo de difusión radial simple (DRS, por sus siglas en inglés) fue desarrollado por Wood et al. (*J Biol Standardization* 5: 237-47, 1997), que determina el nivel de antígeno de HA en una muestra. El ensayo DRS compara la zona de los sitios de difusión de un antígeno de referencia y un antígeno de ensayo (por ejemplo, una vacuna) cuando el antígeno está unido por anticuerpos específicos de HA.

El ensayo DRS y otros ensayos como se han descrito anteriormente y se conocen en la técnica pueden usarse para determinar la cantidad de HA en una muestra de vacuna para la preparación de una vacuna que comprenda una cantidad predeterminada de antígeno de HA.

Formulaciones farmacéuticas y administración

La administración de la composición de vacuna generalmente es con fines profilácticos. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar cualquier infección posterior. Una composición "farmacológicamente aceptable" es una tolerada por un paciente receptor. Se contempla que se administre una cantidad eficaz de la vacuna. Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir un efecto biológico deseado tal como inducir suficiente inmunidad humoral o celular. Esto puede depender del tipo de vacuna, la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor. Los ejemplos de efectos biológicos deseados incluyen, pero no se limitan a, la no producción de síntomas, la reducción de los síntomas, la reducción del título vírico en tejidos o secreciones nasales, la protección completa contra la infección por el virus de la gripe y protección parcial contra la infección por el virus de la gripe.

Una vacuna o composición de la presente invención es fisiológicamente significativa si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor que potencia al menos una respuesta inmunitaria humoral o celular primaria o secundaria contra al menos una cepa de un virus de la gripe infeccioso. La composición de vacuna se administra para proteger contra la infección vírica. No es necesario que la "protección" sea absoluta, es decir, no es necesario que la infección gripal se evite totalmente o se erradique, si existe una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control o un conjunto de pacientes. La protección puede limitarse a la reducción de la gravedad o la rapidez del inicio de los síntomas de la infección por el

virus de la gripe.

En una realización, se proporciona una composición de vacuna atenuada o inactivada de la presente invención ya sea antes de la aparición de la infección (con el fin de prevenir o atenuar una infección anticipada) o después del inicio de una infección real y, de este modo, protege contra la infección vírica.

En un aspecto, los métodos de la invención incluyen una etapa de administración de una composición farmacéutica. El virus, composición antigénica o vacuna se administra por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo a través de inhalación, por vía intranasal, por vía oral y por vía parenteral. Los ejemplos de vías parentales de administración incluyen la administración intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea.

En una realización, la administración de la vacuna de la gripe se basa en el número de unidades de hemaglutinina (UHA) por dosis. Una UHA se define como la cantidad de antígeno necesaria para conseguir el 50 % de aglutinación en un ensayo de hemaglutinina convencional con eritrocitos de pollo. Las vacunas de virus de la gripe aviar como se describen en el presente documento son eficaces en formulaciones que comprenden unidades de HA (UHA) entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 1 µg, entre aproximadamente 20 ng y aproximadamente 500 ng, entre aproximadamente 50 ng y aproximadamente 250 ng, entre aproximadamente 75 ng y aproximadamente 200 ng, aproximadamente 100 ng, aproximadamente 125 ng, aproximadamente 150 ng o aproximadamente 175 ng. En una realización relacionada, una composición de vacuna que comprende un virus inactivado comprende una cantidad de virus que corresponde a aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 µg de proteína hemaglutinina/ml o cualquier intervalo o valor dentro de la misma. En una realización relacionada, una composición de vacuna de la presente invención comprende de aproximadamente 10^2 a 10^9 unidades formadoras de placa (UFP)/ml o cualquier intervalo o valor dentro de las mismas, donde se atenúa el virus. En algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende aproximadamente 10^2 , aproximadamente 10^3 , aproximadamente 10^4 , aproximadamente 10^5 , aproximadamente 10^6 , aproximadamente 10^7 , aproximadamente 10^8 o aproximadamente 10^9 UFP/ml. Se contempla adicionalmente que la composición de vacuna comprenda de 10^2 a aproximadamente 10^4 UFP/ml, de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 UFP/ml o de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 UFP/ml.

En otro aspecto, la vacuna de virus de la gripe inactivado se cuantifica mediante un ensayo de difusión radial simple (DRS) (véase Kistner et al., *Vaccine* (2007) 25: 6028-36 y Wood, et al., *J. Biol. Stand.* (1997) 5: 237-247) y se expresa en microgramos de hemaglutinina (por ml o por dosis). En una realización, la dosis de una vacuna estacional es de 15 µg por cepa, 45 µg en total en tres dosis. Para vacunas (pre)pandémicas la dosis normalmente depende del adyuvante. En un aspecto, el intervalo de dosis es de 1 µg a 15 µg por vacuna, y, en algunas preparaciones, son útiles hasta 75 µg por vacuna. En una realización, la dosis de vacuna se administra a una dosis de 1 µg a 100 µg de HA. En una realización adicional, la vacuna comprende un contenido de HA de 1 µg a 30 µg por vacuna. En realizaciones relacionadas, la dosis de vacuna se administra a 1 µg, a 3 µg, a 5 µg, a 7,5 µg, a 10 µg, a 12,5 µg, a 15 µg, a 20 µg, a 25 µg o a 30 µg de HA, o en cualquier cantidad de hasta 100 µg según sea necesario. Se contempla que, en algunas realizaciones, la dosis de la vacuna se ajusta basándose en el adyuvante utilizado para la preparación de vacunas.

En consecuencia, las dosificaciones de vacunas individuales incluyen las que tienen aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 3 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 8 µg, aproximadamente 9 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 11 µg, aproximadamente 12 µg, aproximadamente 13 µg, aproximadamente 14 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 16 µg, aproximadamente 17 µg, aproximadamente 18 µg, aproximadamente 19 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 21 µg, aproximadamente 22 µg, aproximadamente 23 µg, aproximadamente 24 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 35 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 55 µg, aproximadamente 60 µg, aproximadamente 65 µg, aproximadamente 70 µg, aproximadamente 75 µg, aproximadamente 80 µg, aproximadamente 85 µg, aproximadamente 90 µg, aproximadamente 95 µg, aproximadamente 100 µg y más de 100 µg de hemaglutinina proporcionada en dosis individuales o múltiples en la misma o diferente cantidad de hemaglutinina.

Cuando se administra como una solución, la vacuna se prepara en forma de una solución acuosa. Dichas formulaciones se conocen la técnica y se preparan mediante disolución del antígeno y otros aditivos apropiados en el disolvente apropiado. Dichos disolventes incluyen agua, solución salina, etanol, etilenglicol y glicerol, por ejemplo. Los aditivos adecuados incluyen colorantes certificados y conservantes antimicrobianos, tales como timerosal (tiosalicilato de etilmercurio sódico). Dichas soluciones pueden estabilizarse usando métodos convencionales, por ejemplo, mediante la adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular y puede tamponarse mediante métodos convencionales, usando, por ejemplo, reactivos tales como hidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de potasio y/o dihidrógeno fosfato de potasio o TRIS. Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones. La preparación de suspensiones incluye, por ejemplo, el uso de un molino coloidal, y las emulsiones incluyen, por ejemplo, el uso de un homogeneizador.

En una realización, se contempla que el vehículo de vacuna sea un sistema polimérico de liberación retardada. Los polímeros sintéticos son útiles en la formulación de una vacuna para efectuar la liberación controlada de antígenos

usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Aspectos y detalles adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que tienen por objeto ser ilustrativos más que limitantes.

5

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Generación de la cepa A/Vietnam/1203/04 atenuada con sitio de escisión modificado por genética inversa

La cepa vírica A/Vietnam/1203/04 (H5N1) es una cepa altamente patógena que se aisló de un caso mortal de gripe humana. Para atenuar esta cepa el tramo polibásico de aminoácidos (RRRK (SEQ ID NO: 15)) en el sitio de escisión de HA se eliminó. Se introdujeron sustituciones adicionales (R → T y K → T) para evitar la formación nuevamente de los aminoácidos polibásicos mediante interrupción de la polimerasa como se describe por Horimoto et al., (*Vaccine*. 24: 3669-76, 2006). Esta modificación disminuye el principal factor patógeno del virus de la gripe aviar altamente patógena y lo convierte en el fenotipo poco patógeno.

15

Se obtuvieron células Vero de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC por sus siglas en inglés, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido) en el pase 134. Las células Vero se cultivaron en medio OPTI-PRO® (Gibco, Carlsbad, CA) complementado con L-glutamina 4 mM.

20

El virus se propagó en células Vero en medio OPTI-PRO® que contenía tripsina 5 µg/ml (Sigma, San Luis, MO) a 37 °C y CO₂ al 5 %. El título infeccioso del virus se determinó mediante análisis DICT50 convencional. El ensayo de hemaglutinación se realizó con suspensión al 0,5 % de eritrocitos de pollo. El crecimiento del virus con o sin tripsina se determinó mediante prueba de ensayo de placa convencional en células Vero en medio OPTI-PRO® que contenía L-glutamina 4 mM; tripsina 5 µg/ml, DEAE al 0,01 %-dextrano (Sigma), agar al 0,6 % (Sigma) y se expresó en unidades formadoras de placa (ufp).

25

Se construyó el virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1) con un sitio de escisión modificado en la proteína HA. Se sintetizaron ADNc correspondientes a segmentos PB2, PB1, PA, HA, NA, NP, M y NS de A/Vietnam/1203/04 en Genart AG (Regensburg, Alemania) de acuerdo con las secuencias publicadas en GenBank (números de acceso: AY818135 para HA, AY818141 para NA, AY818144 para M, AY818138 para NP, AY818147 para NS, AY818132 para PA, PB1 para AY818129 y AY818126 para PB2).

30

35

Puesto que las regiones no codificantes (RNC) víricas para los segmentos de A/Vietnam/1203/04 solo estaban disponibles parcialmente, se añadieron RNC derivadas de los respectivos segmentos de A/Hong Kong/213/03 a las secuencias de codificación de Vietnam/1203/2004 (números de acceso para A/Hong Kong/213/03: HA: AB212054; NA: AB212056; M: AB212057; NP: AB212055; NS: AB212058; PA: AB212053; PB1: AB212052; PB2: AB212050).

40

El sitio de escisión polibásico de HA de la cepa altamente patógena A/Vietnam/1203/04 (H5N1) se reemplazó por la secuencia dependiente de tripsina TETR/GLF encontrada en cepas H5 de baja acción patógena (Figura 1). La modificación del gen de la HA incluyó la retirada del tramo de aminoácidos básicos en el sitio de escisión de HA y la sustitución de los aminoácidos básicos vecinos arginina (R) y lisina (K) a treonina (T), NTPQRERRRRKRGLFGAI (SEQ ID NO: 16) → NTPQTETRGLFGAI (SEQ ID NO: 17), con el fin de evitar la posible reversión al fenotipo de tipo silvestre.

45

La Figura 1 muestra la modificación de las secuencias nucleotídicas del sitio de escisión de HA de los genes víricos. Las RNC derivadas de A/Hong Kong/213/03 están subrayadas en la Figura 1. Se obtuvieron copias de ADNc de fragmentos genómicos mediante PCR y los productos de PCR se usaron para la transfección de células Vero. La transfección se realizó de acuerdo con el método de Hoffmann et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 97: 6108-113, 2000) usando ocho ADNc que contenían el genoma vírico completo.

50

Se sembraron células Vero transfectadas en una placa de 6 pocillos en medio de transfección que contenía suero (DMEM/F12 + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 %). Las células se incubaron a 37 °C. Seis horas después de la transfección el medio se reemplazó por medio OPTI-PRO® sin suero complementado con L-glutamina 4 mM y tripsina 1 µg/ml. Después de 24 horas se añadió medio sin suero adicional que contenía 10 µg de tripsina al sobrenadante. Después de 72 horas el sobrenadante se cosechó y se usó para un pase adicional más en célula Vero recién preparada (pase ciego). La incubación de este pase duró hasta que se observó el desarrollo de un efecto citopático (ECP) del 100 % y después se recogió el sobrenadante. El virus resultante se denominó A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt o attVN1203.

55

60

Se realizaron dos pases de virus secuenciales de virus rescatado en células Vero en diluciones limitantes. Para este fin se infectó una placa de 24 pocillos de células Vero confluentes con diluciones con factor de dilución 10 de virus cosechado hechas en 4 repeticiones. En 2 días se recogieron dos pocillos en dilución (-5) y se usaron para la segunda etapa. La segunda etapa se realizó de la misma manera. El virus, recogido después de 2 días en dilución (-

65

6), se usó para la producción de reserva del virus. Se infectó un matraz de T150 cm² Rouxflask con una monocapa confluyente de células Vero con el virus recogido en el último pase usando una multiplicidad de infección (moi) de 0,0005. Después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente el inóculo se retiró y se añadieron 50 ml de medio sin suero complementado con tripsina 5 µg/ml. En 48 horas, se había desarrollado un ECP del 100 % y se recogió el sobrenadante, se clarificó por centrifugación a 160g durante 10 minutos, se dividió en alícuotas de 1 ml en tubos criogénicos y se congelaron a -80 °C.

El título infeccioso de la reserva del virus A/Vietnam/1203/04-HAatt producido en células Vero se determinó mediante titulación usando el ensayo de DICT50 en células Vero. Se realizaron dos titulaciones independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En comparación con la propagación en huevos, el título de virus de la producción en células Vero fue aproximadamente 10 veces mayor.

Tabla 2. Título infeccioso de la reserva del virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt

Experimento	Título infeccioso, log ₁₀ DICT50/ml
1	8,87
2	8,55

La secuencia del gen de la HA del virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt (H5N1) se modificó mediante ingeniería genética de manera que se eliminara el tramo polibásico de aminoácidos en el sitio de escisión de HA. Esta modificación lo convirtió en el fenotipo poco patógeno que no presenta ninguna amenaza para los seres humanos.

Para confirmar el fenotipo poco patógeno de la cepa A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt obtenida se determinó la capacidad de producir placas sin tripsina. En un ensayo en placa en células Vero en presencia de tripsina el virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt produjo placas (título 2x10⁷ UFP/ml). Por el contrario, el virus no formó placas en ausencia de tripsina corroborando el fenotipo no patógeno del virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt. Para confirmar la identidad del virus rescatado con respecto a las secuencias clonadas, se verificaron las secuencias de los genes de la HA y de la NA. No se encontraron cambios en ninguno de los genes secuenciados.

Estos resultados demuestran que el virus reagrupado que comprende los genes internos (estructura principal) de la cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) del virus de la gripe y un gen de la HA atenuado y un gen de la NA de tipo silvestre del mismo virus se adapta al crecimiento en cultivo celular y presenta una antigenicidad reducida en comparación con el virus de tipo silvestre.

Ejemplo 2

Generación de cepa A/Indonesia/5/05 (transflectante 2:6 de A/Vietnam/1203/04) atenuada con sitio de escisión modificado por genética inversa

La cepa vírica A/Indonesia 5/05 (H5N1) es una cepa altamente patógena que se aisló de un caso mortal de gripe humana. Para atenuar esta cepa el tramo polibásico de aminoácidos (RRKK [SEQ ID NO: 21]) en el sitio de escisión de HA se eliminó. Se introdujeron sustituciones adicionales (R → T y S → T) para evitar la formación nuevamente de los aminoácidos polibásicos (Horimoto et al., *Vaccine* 24: 3669-76, 2006). Esta modificación debería disminuir el principal factor patógeno del virus de la gripe aviar altamente patógeno y convertirlo en el fenotipo poco patógeno.

El cultivo celular y la propagación vírica se realizaron como se ha descrito anteriormente. Se construyó el virus A/Indonesia/5/05 similar a (H5N1) con un sitio de escisión modificado en la proteína HA. Se sintetizaron ADNc correspondientes a HA y NA de A/Indonesia/5/05 y segmentos PB2, PB1, PA, NP, M y NS de A/Vietnam/1203/04 en Genart AG (Regensburg, Alemania) de acuerdo con las secuencias publicadas en GenBank (números de acceso: ISDN125873 para HA, ISDN125875 para NA, AY818144 para M, AY818138 para NP, AY818147 para NS, AY818132 para PAT AY818129 para PB1 y AY818126 para PB2).

Puesto que las regiones no codificantes (RNC) víricas para los segmentos de A/Vietnam/1203/04 solo estaban disponibles parcialmente, se añadieron RNC derivadas de los respectivos segmentos de A/Hong Kong/213/03 a las secuencias codificantes de A/Indonesia/5/05 y de Vietnam/1203/2004 (números de acceso para A/Hong Kong/213/03 HA: AB212054; NA: AB212056; M: AB212057; NP: AB212055; NS: AB212058; PA: AB212053; PB1: AB212052; PB2: AB212050). El sitio de escisión polibásico de HA de la cepa altamente patógena A/Indonesia/5/05 (H5N1) se reemplazó por la secuencia dependiente de tripsina TETR/GLF encontrada en cepas H5 de baja acción patógena (Figura 2). La modificación del gen de la HA incluyó la retirada del tramo de aminoácidos básicos en el sitio de escisión de HA y la sustitución de los aminoácidos básicos vecinos R y S a T con el fin de evitar la posible reversión al fenotipo de tipo silvestre, como se indica a continuación: NTPQREARAKKRGFLGAI (SEQ ID NO: 16) → NTPQTETRGLGFLGAI (SEQ ID NO: 17). La Figura 2 muestra la modificación del sitio de escisión de la HA de A/Indonesia/5/05 y las secuencias nucleotídicas de los genes víricos. Las RNC derivadas de A/Hong Kong/213/03 están subrayadas.

Se obtuvieron copias de ADNc de fragmentos genómicos mediante PCR y los productos de PCR se usaron para la

transfección de células Vero. Las células Vero transfectadas se sembraron en una placa de 6 pocillos en medio de transfección que contenía suero (DMEM/F12 + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 %). Las células se incubaron a 37 °C. Seis horas después de la transfección el medio se reemplazó por medio OPTIPRO® sin suero complementado con L-glutamina 4 mM y tripsina 1 µg/ml. Después de 24 horas, se añadió medio sin suero adicional que contenía 10 µg de tripsina al sobrenadante. Después de 72 horas, el sobrenadante se recogió y se utilizó para un pase adicional más en la célula Vero recién preparada (pase ciego). La incubación de este pase se mantuvo hasta el desarrollo de un efecto citopático (ECP) del 100 % y después se recogió el sobrenadante. El virus resultante se denominó A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt o RG-attVN1203/IN5/05.

Se realizaron dos pases de virus secuenciales de virus rescatado en células Vero en diluciones limitantes. Para este fin se infectó una placa de 24 pocillos de células Vero confluentes con diluciones con factor de dilución 10 de virus cosechado hechas en 4 repeticiones. En 2 días se recogieron dos pocillos en dilución (-5) y se usaron para la segunda etapa. La segunda etapa se realizó de la misma manera. El virus, recogido después de 2 días en dilución (-6), se usó para la producción de reserva del virus. Se infectó un matraz de T150 cm² Rouxflask con una monocapa confluyente de células Vero con el virus recogido en el último pase usando una multiplicidad de infección moi de 0,0005. Después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente el inóculo se retiró y se añadieron 50 ml de medio sin suero complementado con tripsina 5 µg/ml. Después de 48 horas, se había desarrollado un ECP del 100 % y se recogió el sobrenadante, se clarificó por centrifugación a 160g durante 10 minutos, se dividió en alícuotas de 1 ml en tubos criogénicos y se congelaron a -80 °C.

El título infeccioso de la reserva de virus A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt producido en células Vero se estimó mediante titulación usando un ensayo DICT50 en células Vero. Se realizaron dos titulaciones independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Título infeccioso de la reserva de virus A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt

Experimento	Título infeccioso, log ₁₀ DICT50/ml
1	9,04
2	8,72

La secuencia del gen de la HA del virus A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt se modificó mediante ingeniería genética de manera que se eliminara el tramo polibásico de aminoácidos en el sitio de escisión de la HA. Esta modificación o convirtió en el fenotipo poco patógeno que no presenta ninguna amenaza para los seres humanos. Para confirmar el fenotipo poco patógeno de la cepa A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt obtenida se determinó la capacidad para producir placas sin tripsina. En un ensayo en placa en células Vero en presencia de tripsina el virus A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt produjo placas (título 3x10⁷ UFP/ml). Por el contrario, el virus no formó placas en ausencia de tripsina corroborando el fenotipo no patógeno del virus A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt.

Para confirmar la identidad del virus rescatado con respecto a las secuencias clonadas, se verificaron las secuencias de los genes de la HA y de la NA. No se descubrieron cambios en ninguno de los genes secuenciados.

Estos resultados demuestran que un virus reagrupado que comprende los genes internos (estructura principal) de la cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) del virus de la gripe y un gen de la HA atenuado y un gen de la NA de tipo silvestre de una cepa H5N1 del virus de la gripe diferente (A/Indonesia/5/05) se adapta al crecimiento en cultivo celular y presenta una antigenicidad reducida en comparación con el virus de tipo silvestre.

El crecimiento de los virus atenuados en cultivo en células Vero después se comparó con el crecimiento de un virus de genética inversa adaptado a huevo en células Vero.

La cepa del virus de la gripe CDC RG Indo/05/2005 es una cepa de genética inversa 6:2 con estructura principal PR8 (seis genes internos derivados de PR8) y los genes de la HA y de la NA derivados de la cepa A/Indonesia/05/2005. Esta cepa está adaptada al huevo y es la base para las vacunas de H5N1 inactivadas (derivadas de huevo) convencionales. La cepa CDC RG Indo se hizo pasar tres veces en células Vero a dos temperaturas diferentes, 32 °C y 37 °C a multiplicidades de infección (MOI) de 0,01 a 0,0001. Los títulos se muestran en la Tabla 4. Los logaritmos de los títulos iniciales estaban en el intervalo de 6,4-6,7 (32 °C) y de 5,8-6,8 (37 °C). Después de tres pases, los títulos fueron algo mayores, 7,1-7,2 a 32 °C y 6,5-7,4 a 37 °C. Por tanto, los títulos iniciales fueron bajos y los pases mejoraron los títulos solo ligeramente.

Tabla 4. Títulos de DICT50 obtenidos con la cepa CDC RG Indo/05/2005 adaptada al huevo				
Vero	MOI	P ^b 1	P2	p3
32 °C	0,01	6,7 c	6,8	7,1
Vero	MOI	P ^b 1	P2	p3
	0,001	6,6	6,7	7,2
	0,0001	6,4	6,8	7,2

37 °C	0,01	6,8	7,1	7,0
	0,001	6,7	7,2	7,4
	0,0001	5,8	6,9	6,5
a Pase; MOI, multiplicidad de infección; c, título en DICT50/ml				

Los nuevos virus de la gripe virus Vietnam/1203/04 (H5N1)-HAatt crecieron a un título promedio de 8,71 log₁₀ DICT50/ml. El título del virus A/Indonesia/5/05 (H5N1)-HAatt fue de 8,88 DICT50/ml (Ejemplos 1 y 2). En comparación con la cepa adaptada al huevo coincidente CDC RG Indo/05/2005, la nueva cepa creció al menos dos escalones logarítmicos más que el virus adaptado al huevo.

Ejemplo 3

Seguridad y eficacia de los virus reagrupados

Con el fin de determinar la seguridad y eficacia de los virus reagrupados, se realizaron estudios in vivo en ratones y pollos. Se expusieron ratones Balb/c de 10-12 semanas de edad (Charles River, Sulzfeld, Alemania) por vía intranasal con dosis crecientes de los virus como se indica en la Tabla 4A y 4B (síntomas clínicos: r, pelo erizado; h, encorvado; m, mate (sin brillo); d, muerto; AST = tiempo promedio hasta la muerte).

En el primer experimento en ratones (Tabla 5A), los ratones se controlaron clínicamente durante un periodo de dos semanas. No se observaron síntomas clínicos importantes tras la exposición a los virus RG-attVN1203 o el reagrupado Indonesia 6:2. La mayoría de los ratones no mostraron síntomas clínicos en absoluto; algunos ratones tenían el pelo erizado en la primera semana y se recuperaron por completo en la segunda semana.

En el segundo experimento en ratones (Tabla 5B), las dosis se incrementaron hasta 1x10⁶ DICT50 por animal, administradas por vía intranasal. Esta vez se controló la pérdida de peso (PP), un indicador fiable de enfermedad. No se observó ninguna PP con los virus RG basados en H5N1, todos los ratones sobrevivieron, indicando que no había virulencia. El control de exposición de tipo silvestre, las cepas de tipo silvestre de H5N1 VN1203 y IN5/05, mataron a los ratones a los 6 a 8 días.

Para examinar la seguridad de los virus reagrupados en pollos, se expusieron pollos de siete días de edad (Spafas, Hungría) a dosis crecientes de los virus como se indica en la Tabla 5C y 5D. Los animales se controlaron clínicamente durante un periodo de dos semanas.

Como se muestra en la Tabla 5C, en todos los pollos expuestos por vía intranasal con dosis de 1x10⁵ y 1x10⁶ DICT50 por animal, no se pudieron observar síntomas clínicos importantes con los virus RG basados en H5N1. Como era de esperar, un virus de control BSL-2 obtenido de CDC (CDC RG Indo/05/2005, una cepa de virus de semilla pre pandémica basada en PR8) tampoco fue virulento ni patógena para los pollos.

Con el fin de confirmar este resultado usando una segunda vía de aplicación, los pollos se expusieron mediante inyección intramuscular (Tabla 5D) a una dosis de 1x10⁶ DICT50 por animal. Se incluyeron dos virus de control, conocidos por no ser virulentos para los pollos, CDC RG Indo/05/2005 y NIBRG-14 (reagrupados a base de PR8 con los genes de la HA y de la NA IN5/05 y VN1194, respectivamente). No pudo observarse pérdida de peso después de la exposición. Todos los animales ganaron peso en comparación con los animales de control, pollos expuestos a solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el mismo experimento, se expusieron pollos por vía intranasal con el virus de tipo silvestre de H5N1 altamente patógeno IN5/05. Todos los pollos murieron en una fase aguda después de la exposición dos días después de la exposición (Tabla 5D).

Estos experimentos in vivo confirman que la modificación del sitio de escisión polibásico en el gen de la HA atenúa fuertemente el virus H5N1.

Tabla 5

Experimento	Animales número	Expo/vía	Virus DICT ₅₀	Control clínico		AST	
				Síntomas	Peso	Sobrevividos/total (días)	Seroconversión Ensayos de HI y NT
A H5N1-131/RG 08-01 Ratones	6	1x10E3 en	HG-attVN1203	-	n.d.	6/6	n.a.
	6	1x10E4 en	HG-attVN1203	-	n.d.	6/6	n.a.
	6	1x10E5 en	HG-attVN1203	-	n.d.	6/6	n.a.
	6	1x10E3 en	RG-attVN1203/IN5/05	-	n.d.	6/6	n.a.
	6	1x10E4 en	RG-attVN1203/IN5/05	-	n.d.	6/6	n.a.
	6	1x10E5 en	RG-attVN1203/IN5/05	-	n.d.	6/6	n.a.
B HSN1-RG 08-02 Ratones	6	1x10E4 en	RG-attVN1203	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E5 en	RG-attVN1203	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E6 en	RG-attVN1203	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E4 en	RG-attVN 1203/IN5/05	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E5 en	RG-attVN 1203/IN5/05	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E6 en	RG-attVN 1203/IN5/05	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
C H5N1-RG 08-03 Pollos (7 días)	6	1x10E5 en	VN1203 wt	r, h, m, d	n.d.	6/6	6
	6	1x10E5 en	IN5/05 wt	r, h, m, d	n.d.	0/6	6-8
	5	1x10E5 en	RG-attVN1203	-	sin pérdida de peso	5/5	n.a.
	5	1x10E6 en	RG-attVN1203	-	sin pérdida de peso	5/5	n.a.
	5	1x10E5 en	RG-attVN1203/IN5/05	-	sin pérdida de peso	5/5	n.a.
	5	1x10E6 en	RG-attVN1203/IN5/05	-	sin pérdida de peso	5/5	n.a.
D H5N1-RG 08-04 Pollos (7 días)	5	1x10E5 en	RG-CDC-IN5/05	-	sin pérdida de peso	5/5	n.a.
	5	n.a.	PBS	-	sin pérdida de peso	5/5	n.a.
	6	1x10E6 en	RG-attVN1203	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E6 en	RG-attVN1203/IN5-05	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E6 en	HG-COC-IN5/05	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10E6 en	NBRG-14	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	4	n.a.	PBS	-	sin pérdida de peso	6/6	n.a.
	6	1x10ES en	IN5/05en peso	Muerte (hiperaguda)	n.d.	0/6	2
							n.d.

Ejemplo 4**Generación de cepa A/Pavo/Turquía/1/05 atenuada con sitio de escisión modificado mediante genética inversa**

La cepa del virus A/pavo/Turquía/1/05 (H5N1) es una cepa altamente patógena que se aisló de un caso de gripe aviar fatal. Con el fin de atenuar esta cepa, se eliminó el tramo polibásico de aminoácidos (RRRK (SEQ ID NO: 15)) en el sitio de escisión de HA. Se introdujeron sustituciones adicionales (R → T y K → T)) para evitar la formación nuevamente de los aminoácidos polibásicos (Horimoto et al., *Vaccine*. 24: 3669-76, 2006). Esta modificación debería disminuir el principal factor patógeno del virus de la gripe aviar altamente patógena y convertirlo en el fenotipo poco patógeno.

El cultivo celular y la propagación vírica se realizaron como se ha descrito anteriormente. Se construyó un virus A/Pavo/Turquía/1/05 similar a (H5N1) como con un sitio de escisión modificado en la proteína HA. Se sintetizaron ADNc correspondientes a la HA y la NA de A/pavo/Turquía/1/05 y a los segmentos PB2, PB1, PA, NP, M y NS de A/Vietnam/1203/04 en Geneart AG (Regensburg, Alemania) de acuerdo con las secuencias publicadas en GenBank (números de acceso: DQ407519 para HA, EF619973 para NA, EF541453 para M, AY818138 para NP, EF541456 para NS, AY818132 para PA, AY818129 para PB1 y AY818126 para PB2).

Puesto que las regiones no codificantes (RNC) para los segmentos de A/Vietnam/1203/04 solo estaban disponibles parcialmente, se añadieron RNC derivadas de los segmentos de A/Hong Kong/213/03 respectivos a las secuencias codificantes de A/Indonesia/5/05 y de Vietnam/1203/2004 (números de acceso para A/Hong Kong/213/03 HA: AB212054; NA: AB212056; M: AB212057; NP: AB212055; NS: AB212058; PA: AB212053; PB1: AB212052; PB2: AB212050). El sitio de escisión polibásico de HA de la cepa altamente patógena A/Pavo/Turquía/1/05 se reemplazó por la secuencia dependiente de tripsina TETR/GLF (véase la SEQ ID NO: 19) encontrada en cepas H5 poco patógenas (Figura 3). La modificación del gen de la HA incluyó la retirada del tramo de aminoácidos básicos en el sitio de escisión de la HA y la sustitución de los aminoácidos básicos vecinos R y K a T con el fin de evitar la posible reversión al fenotipo de tipo silvestre, como se indica a continuación: NSPQRERRRRKKRGLFGAI (SEQ ID NO: 18) → NSPQTETRGLFGAI (SEQ ID NO: 19). La Figura 3 muestra la modificación del sitio de escisión de la HA de A/Pavo/Turquía/1/05 y las secuencias nucleotídicas de los genes víricos. Las RNC derivadas de A/Hong Kong/213/03 están subrayadas.

Se obtuvieron copias de ADNc de fragmentos genómicos mediante PCR y los productos de PCR se usaron para la transfección de células Vero. Las células Vero transfectadas se sembraron en una placa de 6 pocillos en medio de transfección que contenía suero (DMEM/F12 + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 %). Las células se incubaron a 37 °C. Seis horas después de la transfección el medio se reemplazó por medio OPTIPRO® sin suero complementado con L-glutamina 4 mM y tripsina 1 µg/ml Y anfotericina B 0,25 µg/ml. Después de 24 horas, se añadió medio sin suero adicional que contenía 10 µg de tripsina al sobrenadante. Después de 72 horas, el sobrenadante se recogió y se utilizó para dos pases adicionales más en la célula Vero recién preparada (pase ciego). La incubación de este pase se mantuvo hasta el desarrollo de un efecto citopático (ECP) del 100 % y después se recogió el sobrenadante. El virus resultante se denominó A/pavo/Turquía/1/05 (H5N1)-HAatt o RGattVN1203/TT/1/05.

Se produjo una reserva de virus A/pavo/Turquía/1/05 como se ha descrito anteriormente. El título infeccioso de la reserva de virus A/pavo/Turquía/1/05 (H5N1)-HAatt producido en células Vero se estimó mediante titulación usando el ensayo de DICT50 en células Vero. Se realizaron dos titulaciones independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6 - Título infeccioso de la reserva del virus RG-attVN1203/TT/1/05

Experimento	Título infeccioso, log ₁₀ DICT50/ml
1	8,83
2	8,85

Para confirmar la identidad del virus rescatado con respecto a las secuencias clonadas, se verificaron las secuencias de los genes de la HA y de la NA. No se descubrieron cambios en ninguno de los genes secuenciados.

Estos resultados demuestran que un virus reagrupado que comprende los genes internos (estructura principal) de la cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) del virus de la gripe y un gen de la HA atenuado y un gen de la NA de tipo silvestre de una cepa de H5N1 del virus de la gripe diferente (A/pavo/Turquía/1/05) se adapta al crecimiento en cultivo celular.

Ejemplo 5**Generación de una cepa A/Anhui/01/05 atenuada con sitio de escisión modificado mediante genética inversa**

La cepa del virus A/Anhui/01/05 (H5N1) es una cepa altamente patógena que se aisló de un caso de gripe humana

fatal en China. Con el fin de atenuar esta cepa se eliminó el tramo polibásico de aminoácidos (RRRK (SEQ ID NO: 15)) en el sitio de escisión de la HA. Se introdujeron sustituciones adicionales (L → Q, R → T y K → T) para evitar la formación nuevamente de los aminoácidos polibásicos (Horimoto et al., *Vaccine*. 24: 3669-76, 2006). Esta modificación debería disminuir el principal factor patógeno del virus de la gripe aviar altamente patógena y convertirlo en el fenotipo poco patógeno.

El cultivo celular y la propagación vírica se realizaron como se ha descrito anteriormente. Se construyó un virus A/Anhui/01/05 similar a (H5N1) con un sitio de escisión modificado en la proteína HA. Se sintetizaron ADNc correspondientes a la HA y la NA de A/Anhui/01/05 y a los segmentos PB2, PB1, PA, NP, M y NS de A/Vietnam/1203/04 en Geneart AG (Regensburg, Alemania) de acuerdo con las secuencias publicadas en GenBank (números de acceso: DQ371928 para HA, EU128239 para NA, EF541453 para M, AY818138 para NP, EF541456 para NS, AY818132 para PA, AY818129 para PB1 y AY818126 para PB2).

Puesto que las regiones no codificantes (RNC) para los segmentos de A/Vietnam/1203/04 solo estaban disponibles parcialmente, se añadieron RNC derivadas de los segmentos de A/Hong Kong/213/03 respectivos a las secuencias codificantes de A/Indonesia/5/05 y de Vietnam/1203/2004 (números de acceso para A/Hong Kong/213/03 HA: AB212054; NA: AB212056; M: AB212057; NP: AB212055; NS: AB212058; PA: AB212053; PB1: AB212052; PB2: AB212050). El sitio de escisión polibásico de HA de la cepa altamente patógena A/Anhui /01/05 se reemplazó por la secuencia dependiente de tripsina TETR/GLF encontrada en cepas H5 poco patógenas (Figura 4). La modificación del gen de la HA incluyó la retirada del tramo de aminoácidos básicos en el sitio de escisión de la HA y la sustitución de los aminoácidos básicos vecinos L a Q y R y K a T con el fin de evitar la posible reversión al fenotipo de tipo silvestre, como se indica a continuación: NSPLRERRRKKRGLFGAI (SEQ ID NO: 20) → NSPQTETRGGLFGAI (SEQ ID NO: 19). La Figura 4 muestra la modificación del sitio de escisión de la HA de A/Anhui /01/05 y las secuencias nucleotídicas de los genes víricos. Las RNC derivadas de A/Hong Kong/213/03 están subrayadas.

Se obtuvieron copias de ADNc de fragmentos genómicos mediante PCR y los productos de PCR se usaron para la transfección de células Vero. Las células Vero transfectadas se sembraron en una placa de 6 pocillos en medio de transfección que contenía suero (DMEM/F12 + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 %). Las células se incubaron a 37 °C. Seis horas después de la transfección el medio se reemplazó por medio OPTIPRO® sin suero complementado con L-glutamina 4 mM y tripsina 1 µg/ml Y anfotericina 0,25 µg/ml. Después de 24 horas, se añadió medio sin suero adicional que contenía 10 µg de tripsina al sobrenadante. Después de 72 horas, el sobrenadante se recogió y se utilizó para dos pases adicionales más en la célula Vero recién preparada (pase ciego). La incubación de este pase se mantuvo hasta el desarrollo de un efecto citopático (ECP) del 100 % y después se recogió el sobrenadante. El virus resultante se denominó A/Anhui /01/05 (H5N1)-HAatt o RG-attVN1203/AH/1/05.

Se produjo una reserva vírica de A/Anhui /01/05 como se ha descrito anteriormente. El título infeccioso de la reserva del virus RG-attVN1203/AH/1/05 producido en células Vero se estimó mediante titulación usando el ensayo de DICT50 en células Vero. Se realizaron dos titulaciones independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 - Título infeccioso de la reserva del virus RG-attVN1203/AH/1/05

Experimento	Título infeccioso, log ₁₀ DICT50/ml
1	8,75
2	8,50

Para confirmar la identidad del virus rescatado con respecto a las secuencias clonadas, se verificaron las secuencias de los genes de la HA y de la NA. No se descubrieron cambios en ninguno de los genes secuenciados.

Estos resultados demuestran que un virus reagrupado que comprende los genes internos (estructura principal) de la cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) del virus de la gripe y un gen de la HA atenuada y un gen de la NA de tipo silvestre de una cepa de H5N1 del virus de la gripe diferentes (A/Anhui/1/05) se adapta al crecimiento en cultivo celular.

Ejemplo 6

Administración de vacuna de virus reagrupado in vivo

Con el fin de determinar la eficacia in vivo del virus reagrupado recombinante (virus entero) que expresa genes de la HA y de la NA internos de H5N1, el virus se administra a los sujetos animales usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, Kistner et al., (*Vaccine*. 25: 6028-36, 2007) describe la administración de una vacuna vírica que comprende la cepa vírica H5N1 inactivada entera A/Vietnam/1203/2004 a los ratones sujeto y la evaluación de la capacidad de la vacuna para proteger contra la infección de los ratones tras una reexposición con virus vivo.

Adicionalmente, Ehrlich et al., (*N Engl J Med*. 358: 2573-84, 2008) describe un ensayo clínico en pacientes humanos que comprende administrar una vacuna para una cepa del virus de la gripe pandémico H5N1. Se administraron dos dosis de la vacuna (con 21 días de diferencia) que comprendía A/Vietnam/1203/2004 completo inactivado a los

sujetos, conteniendo cada dosis 3,75 µg, 7,5 µg, 15 µg o 30 µg de antígeno de hemaglutinina con adyuvante de alumbre o 7,5 µg o 15 µg de antígeno de HA sin adyuvante. Se realizó un análisis serológico al inicio y los días 21 y 42. Ehrlich demostró que la vacuna desencadena una respuesta inmunitaria en sujetos hospedador y el hospedador está protegido contra la infección con varias cepas de virus diferentes.

5 Los virus reagrupados, las composiciones antigénicas o las vacunas de la presente invención se administran usando las técnicas descritas anteriormente o usando otras técnicas conocidas en la técnica.

10 Se espera que se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones de la invención como se expone en los ejemplos ilustrativos anteriores a los expertos en la materia. En consecuencia, solo deberían ponerse a la invención las limitaciones que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Kistner, et al.
 <120> PRODUCCIÓN DE VACUNA VÍRICA
 <130> 31315/44111A
 20 <150> US-61/122.961
 <151> 16-12-2008
 <160> 21
 25 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 1767
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Nucleótido sintético
 35 <400> 1

ES 2 675 771 T3

```

agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt ttgcaatagt      60
cagtcttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat gcaaacaact cgacagagca      120
ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac tgttacacat gccaagaca tactggaaaa      180
gaaacacaac gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tgagagattg      240
tagcgtagct ggatggctcc tcggaaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga      300
atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agtcaatgac ctctgttacc caggggattt      360
caatgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca      420
gatcatcccc aaaagtctct ggtccagtca tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg      480
tccataccag ggaaagtcct cctttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag      540
tacataccca acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggtagt      600
gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca aagctctatc aaaacccaac      660
cacctatatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga ttggtacca gaatagctac      720
tagatccaaa gtaaaccgggc aaaatggaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaagcc      780
gaatgatgca atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa      840
aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtga tgggaatatg gtaactgcaa      900
caccaagtg caaactccaa tgggggcgat aaactctagc atgccattcc acaatataca      960
ccctctcacc attggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcgac     1020
tgggctcaga aatagccctc aaaccgagac ccgaggatta tttggagcta tagcaggttt     1080

tatagaggga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggtaccacc atagcaatga     1140
gcaggggagt gggtagctg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac     1200
caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaaggga     1260
atttaacaac ttagaaagga gaatagagaa tttaaacaag aagatggaag acgggttcct     1320
agatgtctgg acttataatg ctgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga     1380
ctttcatgac tcaaatgtca agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa     1440
tgcaaaggag ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcat aaatgtgata atgaatgtat     1500
ggaaagtgta agaaatggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag cgagactaaa     1560
aagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatagga atttaccaaa tactgtcaat     1620
ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact ggcaatcatg gtagctggtc tatccttatg     1680
gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt     1740
gtagttaaaa acacccttgt ttctact                                     1767

```

<210> 2
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nucleótido sintético

<400> 2

5

```

agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct      60
gtatggtaac tggaaatagtt agcttaatgt tacaaattgg gaacatgac tcaatatggg      120
tcagtcattc aattcacaca gggaatcaac accaatctga accaatcagc aataactaatt      180
ttcttactga gaaagctgtg gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca      240
ttaacggatg ggctgtatac agtaaggaca acagtataag gatcgggttc aagggggatg      300
tgtttggtat aagagagccg ttcattctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt      360
tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc      420
ctcacagaac attaatgagt tgcctgtgg gtgaggtcc cccccatat aactcaaggt      480
ttgagtctgt tgcttggtca gcaagtgtt gccatgatgg caccagttgg ttgacgattg      540
gaatttctgg ccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag      600
acactatcaa gaggtaggag aacaacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg      660
taaagtgtct ttgctttact gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata      720
agatcttcaa aatggaaaaa gggaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt      780

atcactatga ggaatgctcc tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg      840
ataattggca tggctcaa atcgccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gaggatcaaa      900
taggatatat atgcagtgga gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta      960
gttgtggtcc ggtgtcctct aacggggcat atggggtaaa aggggtttca tttaaatacg     1020
gcaatggtgt ctggatcggg agaaccaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga     1080
tttgggatcc aaatgggtgg actgaaacgg acagtagctt ttcagtga aaagatatcg     1140
tagcaataac tgattggtca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag     1200
gactagattg cataagacct tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga     1260
gcacaatttg gactagtggg agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg     1320
gttgggtctg gccagacggg gccgagttgc cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa     1380
aaactccttg tttctact

```

<210> 3

<211> 1027

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Nucleótido sintético

15

<400> 3

```

agcaaaagca ggtagatggt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct      60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagaaacttg aagatgtctt      120
tgcaggaaaag aacaccgatc tcgaggctct catggagtgg ctaaagacaa gaccaatcct      180
gtcacctctg actaaaggga ttttgggatt tgtattcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg      240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccagaa tgcctaaat ggaaatggag atccaaataa      300
tatggatagg gcagttaagc tatataagaa gctgaaaaga gaaataacat tccatggggc      360
taaggagggtc gcactcagct actcaaccgg tgcacttgcc agttgcatgg gtctcatata      420
caacaggatg ggaacggtga ctacggaagt ggcttttggc ctagtgtgtg ccacttgtga      480
gcagattgca gattcacagc atcgggtctca cagacagatg gcaactatca ccaaccact      540
aatcagacat gagaacagaa tgggtgctggc cagcactaca gctaaggcta tggagcagat      600
ggcgggatca agtgagcagg cagcggaagc catggagatc gctaatacagg ctaggcagat      660
ggtgcaggca atgaggacaa ttgggactca tcctaactct agtgctggtc tgagagataa      720
tcttcttgaa aatttgcagg cctaccagaa acgaatggga gtgcagatgc agcgattcaa      780
gtgatcctat tgttgttgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgata ttgtggattc      840

ttgatcgtct tttcttcaaa tgcatttctc gtcgccttaa atacggtttg aaaagagggc      900
ctgctacggc aggggtacct gagtctatga gggaagagta ccggcaggaa cagcagagtg      960
ctgtggatgt tgacgatggt cattttgtca acatagaatt ggagtaaaaa actaccttgt     1020
ttctact                                           1027

```

<210> 4
 <211> 875
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 4

ES 2 675 771 T3

```

agcaaaagca gggtagataa tcaactcacc agtgacatca gcatcatggc gtctcaaggc      60
actgctttct ttggcatgtc cgcaaacgat ttgcagacca agaactgggt gatgccccat      120
tccttgaccg gcttcgccga gatcagaagt ccctaagagg aagaggcaac actcttggtc      180
tggacatcga aacagctact cgcgaggaa agcagatagt ggagcggatt ctggaggggg      240
agtctgataa ggcacttaaa atgcccgtt cagctacct aactgacatg actctcgaag      300
aaatgtcaag ggactggttc atgctcatgc ccaagcagaa agtggcagggt tccctttgca      360
tcaaaatgga ccaggcaata atggataaaa ccatcatatt gaaagcaaac ttcagtgtga      420
tttttgaccg gttggaaacc ctaatactac ttagagcttt cacagaagaa ggagcaatcg      480
tgggagaaat ctaccatta ccttctcttc caggacatac tggtagaggat gtcaaaaatg      540
caattggcgt cctcatcgga ggacttgaat ggaatgataa cacagttcga gtcactgaaa      600
ctatacagag attcgcttgg agaaacagtg atgaggatgg gagacttcca ctccctccaa      660
atcagaaacg gtaaattggcg agaacaattg agtcagaagt ttgaagaaat aagggtggctg      720
attgaagaag taagacatag attgaaaatt acagaaaaca gtttcgaaca gataacgttt      780
atgcaagcct tacaactact gcttgaagtg gagcaagaga taagagcctt ctcttttcag      840
cttatttaat gataaaaaac acccttggtt ctact                                     875

```

<210> 5
 <211> 1565
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 5

```

agcaaaagca gggtagataa tcaactcacc agtgacatca gcatcatggc gtctcaaggc      60

```

ES 2 675 771 T3

accaaacgat cttatgaaca gatggaaact ggtggggaac gccagaatgc tactgagatc 120
 agggcatctg ttggaagaat ggttagtggc attgggaggt tctacataca gatgtgcaca 180
 gaactcaaac tcagtgacta tgaaggagg ctgatccaga acagcataac aatagagaga 240
 atggtactct ctgcatttga tgaaagaagg aacagatacc tggagaaca cccagtgcg 300
 ggaaaggacc cgaagaagac tggagggtcca atttatcgga ggagagacgg gaaatgggtg 360
 agagagctaa ttctgtacga caaagaggag atcaggagga tttggcgtca agcgaacaat 420
 ggagaggacg caactgctgg tcttaccac ctgatgatat ggcatccaa tctaaatgat 480
 gccacatata agagaacgag agctctcgtg cgtactggaa tggaccaag gatgtgctct 540
 ctgatgcaag ggtcaactct cccgaggaga tctggagctg ccggtgcagc agtaaagggg 600
 gtagggacaa tggatgatga gctgattcgg atgataaaac gagggatcaa cgaccggaat 660
 ttctggagag gcgaaaatgg aagaagaaca aggattgcat atgagagaat gtgcaacatc 720
 ctcaaagga aattccaaac agcagcaca agagcaatga tggatcaagt gcgagagacg 780
 agaaatcctg ggaatgctga aattgaagat ctcatTTTTc tggcacggtc tgcactcatc 840
 ctgagaggat cagtggccca taagtctctg ttgcctgctt gtgtgtacgg acttgcaagt 900
 gccagtggat atgactttga gagagaaggg tactctctgg ttggaataga tcctttccgc 960
 ctgcttcaaa acagccaggt ctttagtctc attagaccaa atgagaatcc agcacataag 1020
 agtcaattag tgtggatggc atgccactct gcagcatttg aggaccttag agtctcaagt 1080
 ttcacagag ggacaagagt ggtcccaaga ggacagctat ccaccagagg ggttcaaatt 1140
 gcttcaaatt agaacatgga ggcaatggac tccaacactc ttgaactgag aagcagatat 1200
 tgggctataa gaaccagaag cggaggaaaac accaaccagc agagggcatc tgcaggacag 1260
 atcagcgttc agcccacttt ctcggtccag agaaaccttc ccttcgaaag agcgaccatt 1320
 atggcagcat ttacaggaaa tactgagggc agaacgtctg acatgaggac tgaaatcata 1380
 agaatgatgg aaagtgccag accagaagat gtgtcattcc aggggcgggg agtcttcgag 1440
 ctctcggacg aaaaggcaac gaacccgatc gtgccttcct ttgacatgaa taatgaagga 1500
 tcttatttct tcggagacaa tgcagaggag tatgacaatt aaagaaaaat acccttgttt 1560
 ctact 1565

<210> 6
 <211> 2233
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 6

agcgaaagca ggtactgac caaaatggaa gactttgtgc gacaatgctt caatccaatg	60
attgtcgagc ttgcggaaaa ggcaatgaaa gaatatgggg aagatccgaa aatcgaaacg	120
aacaagtttg ctgcaatatg cacacacttg gaggtctgtt tcatgtattc ggattttcac	180
tttattgatg aacggagtga atcaataatt gtagaatctg gagatccgaa tgcattattg	240
aaacaccgat ttgaaataat tgaaggaaga gaccgaacga tggcctggac tgtggtgaat	300
agtatctgca acaccacagg agttgagaaa cctaaatttc tcccagattt gtatgactac	360
aaagagaacc gattcatcga aattggagtg acacggaggg aagttcatatc atactatctg	420
gagaaagcca acaagataaa atccgaggag acacatattc acatattctc attcacaggg	480
gaggaaatgg ccaccaaagc ggactacacc cttgatgaag agagcagggc aagaattaaa	540
accaggctgt tcaccataag gcaggaaatg gccagtaggg gtctatggga ttctttctgt	600
caatccgaga gaggcgaaga gacaattgaa gaaaaatttg aaatcactgg aaccatgcgc	660
agacttgacg accaaaagtct cccaccgaac ttctccagcc ttgaaaactt tagagcctat	720
gtggatggat tcgaaccgaa cggctgcatt gagggcaagc tttctcaaatt gtcaaaagaa	780
gtgaatgcta gaattgagcc atttttgaag acaacgccac gccctctcag actacctgat	840
gggcctcctt gctctcagcg gtcgaagttc ttgctgatgg atgcccttaa attaagcatc	900
gaagaccoga gtcatgaggg ggaggggata ccactatacg atgcaatcaa atgcatgaag	960
acatttttctg gctggaaaga gcccaacatc gtgaaaccac atgaaaaagg tataaaccct	1020
aattacctcc tggcttgga gcaagtgtctg gcagaactcc aagatattga aaatgaggag	1080
aaaatcccaa aaacaaagaa catgaaaaaa acaagccagt tgaagtgggc actcgggtgag	1140
aacatggcac cagagaaagt agactttgag gactgcaaag atgttagcga tctaagacag	1200
tatgacagtg atgaaccaga gtctagatca ctagcaagct ggattcagag tgaattcaac	1260
aaggcatgtg aattgacaga ttcgatttgg attgaactcg atgaaatagg agaagacgta	1320
gctccaattg agcacattgc aagtatgaga aggaactatt ttacagcgga agtatcccat	1380
tgcagggcca ctgaatacat aatgaaggga gtgtacataa acacagccct gttgaatgca	1440
tcctgtgcag ccatggatga ctttcaactg attccaatga taagcaaattg cagaaccaaa	1500
gaaggaagac ggaaaactaa tctgtatgga ttcattataa aaggagagatc ccacttgagg	1560
aatgataccg atgtggtaaa ttttgtgagt atggaattct ctcttactga tccgaggctg	1620
gagccacaca agtgggaaaa gtactgtgtc ctcgagatag gagacatgct cctccggact	1680
gcagtaggcc aagtttcgag gcccatgttc ctgtatgtaa gaaccaatgg aacctccaag	1740

ES 2 675 771 T3

atcaaaatga aatggggcat ggaaatgagg cgatgccttc ttcaatccct tcaacaaatt	1800
gaaagcatga ttgaagccga gtcttctgtc aaagagaagg acatgaccaa agaattcttt	1860
gaaaacaaat cagaaacatg gccgattgga gagtcccca agggagtgga ggaaggctcc	1920
atcggaaagg tgtgcagaac cttgctggcg aagtctgtgt tcaacagttt atatgcatct	1980
ccacaactcg aggggttttc agctgaatca agaaaattgc ttctcattgc tcaggcactt	2040
agggacaacc tggaacctgg gaccttcgat cttggagggc tatatgaagc aattgaggag	2100
tgcctgatta acgatccctg ggttttgctt aatgcgtctt ggttcaactc cttcctcgca	2160
catgcactga aatagttgtg gcaatgctac tatttgctat ccatactgtc caaaaaagta	2220
ccttgtttct act	2233

<210> 7
 <211> 2341
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 7

agcgaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ctttactttt cttgaaagta	60
ccagtgcaaa atgctataag taccaccttc ccttatactg gagaccctcc atacagccat	120
ggaacaggga caggatacac catggacaca gtcaacagaa cacaccaata ttcagaaaag	180
gggaagtgga caacaaacac agagactgga gcacccaac tcaaccgat tgatggacca	240
ctacctgagg ataatgagcc cagtgggtac gcacaaacag attgtgtatt ggaagcaatg	300
gctttccttg aagaatcca cccagggatc tttgaaaact cgtgtcttga aacgatggaa	360
attgttcaac aaacaagagt ggataaactg acccaaggtc gccagaccta tgactggaca	420
ttgaatagaa accaaccggc tgcaactgct ttggccaaca ctatagaaat cttcagatcg	480
aacgggtctaa cagccaatga atcgggacgg ctaatagatt tcctcaagga tgtgatggag	540
tcaatggata aggaagaaat ggagataaca acacatttcc agagaaagag aagggtgagg	600
gacaacatga ccaagaaaat ggtcacacaa agaacaatag ggaagaaaaa acaaaggctg	660
aacaaaaaga gctacctgat aagagcactg aactgaaca caatgacaaa agatgcagaa	720
agaggcaaat tgaagaggcg agcgattgca acaccggaa tgcaaatcag aggattcgtg	780
tactttgttg aaacactagc gaggagtatc tgtgagaaac ttgagcaatc tggactccca	840
gtcggaggga atgagaagaa ggctaaattg gcaaactcgc tgaggaagat gatgactaac	900
tcacaagata ctgaactctc ctttacaatt actggagaca ataccaaatg gaatgagaat	960

ES 2 675 771 T3

cagaatccta	ggatgtttct	ggcaatgata	acgtacatca	caaggaacca	gccagaatgg	1020
tttcggaatg	tcttaagcat	agctcctata	atgtttctcaa	acaaaatggc	gagactagga	1080
aaaggataca	tggtcgaaag	taagagcatg	aagttacgaa	cacaaatacc	agcagaaatg	1140
cttgcaaaca	ttgatcttaa	atacttcaat	gaattaacga	aaaagaaaat	tgagaaaata	1200
aggcctctat	taatagatgg	tacagcctca	ttgagccctg	gaatgatgat	gggcatgttc	1260
aacatgctga	gtacagtcct	aggagtttca	atcctgaatc	ttggacagaa	aaggtaacacc	1320
aaaaccacat	attggtggga	cggactccaa	tcctctgatg	atttcgctct	catcgtaaat	1380
gcaccgaatc	atgaggggaat	acaagcagga	gtggataggt	tttataggac	ttgtaaacta	1440
gttggaatca	atatgagcaa	gaagaagtct	tacataaatc	ggacagggac	atttgaattc	1500
acgagctttt	tctaccgcta	tggatttgta	gccaatctca	gtatggagct	gccagttttt	1560
ggagtgtctg	gaattaatga	atcgcccgac	atgagcattg	gtgttacagt	gataaaaaac	1620
aatatgataa	acaacgacct	tgggccagca	acagctcaga	tggctcttca	gttattcatc	1680
aaggactaca	gatacacata	ccgatgccac	agaggggata	cgcaaatacca	aacaaggaga	1740
tcattcgagc	tgaagaagct	gtgggagcaa	acccgttcaa	aggcaggact	gttggtttca	1800
gatggaggac	caaatctata	caatatccga	aacctccata	ttcctgaagt	ctgcttaaaa	1860
tgggaattga	tggatgaaga	ttaccagggc	agactgtgta	atcctctgaa	tccattcgtc	1920
agccataagg	aaattgaatc	tgtcaacaat	gctgtagtaa	tgccagctca	tggcccggcc	1980
aagagtatgg	aatatgatgc	cgttgcaact	acacattcat	ggattcctaa	aaggaaccgt	2040
tccattctca	atacgagtca	aaggggaatt	cttgaggatg	aacagatgta	ccagaagtgc	2100
tgcaatctat	tcgagaaatt	cttccccagc	agttcatatc	ggaggccagt	tggaatttcc	2160
agcatggtgg	aggccatggt	gtctagggcc	cgaattgacg	cacgaatcga	tttcgagtct	2220
ggaaggatta	agaaaagaaga	gtttgccgag	atcatgaaga	tctgttccac	cattgaagaa	2280
ctcagacggc	aaaaatagtg	aatttagctt	gtccttcgtg	aaaaaatgcc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 8
 <211> 2341
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 8

agcgaaagca ggtcaaatat attcaatatg gagaggataa aagaattacg agatctaattg	60
tcacagtccc gcaactcgga gatactaaca aaaaccactg tggaccatat ggccataatc	120
aagaaataca catcaggaag acaagagaag aaccctgctc tcagaatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaatcac agcggacaag agaataatag agatgattcc tgaaaggaat	240
gaacaagggc agacgctctg gagcaagaca aatgatgctg gatcggacag ggtgatggtg	300
tctcccctag ctgtaacttg gtggaatagg aatgggcccg cgacaagtgc agttcattat	360
ccaaagggtt acaaaacata ctttgagaag gttgaaagat taaaacatgg aaccttcggt	420
cccggttcatt tccgaaacca ggttaaaata cgccgcgcgag ttgatataaa tcttggccat	480
gcagatctca gtgctaaaga agcacaagat gtcacatgag aggtcgtttt cccaaatgaa	540
gtgggagcta gaatattgac atcagagtcg caattgacaa taacgaaaga gaagaaagaa	600
gagctccaag attgtaagat tgctccctta atggttgcat acatgttgga aagggaactg	660
gtccgcaaga ccagattcct accggtagca ggcggaacaa gtagtgtgta cattgaggta	720
ttgcatttga ctcaaggagc ctgctgggaa cagatgtaca ctccaggcgg agaagtgaga	780
aatgacgatg ttgaccagag tttgatcatt gctgccagaa acattgttag gagagcaaca	840
gtatcagcgg atccactggc atcactgctg gagatgtgtc acagcacaca aattgggtggg	900
ataaggatgg tggacatcct taggcaaaat ccaactgagg aacaagctgt ggatatatgc	960
aaagcagcaa tgggtcttag gatcagttct tccttttagct ttggaggctt cactttcaaa	1020
agaacaagtg gatcatccgt caagaaggaa gaggaagtgc ttacaggcaa cctccaaaca	1080
ttgaaaataa gagtacatga ggggtatgag gaattcacaa tgggtgggcg gagggcaaca	1140
gctatcctga ggaaagcaac tagaaggctg attcagttga tagtaagtgg aagagaccaa	1200
caatcaatcg ctgaggcaat cattgtagca atggtgttct cacaggagga ttgcatgata	1260
aaggcagtcg gaggcgatct gaatttcgta aacagagcaa accaaagatt aaaccccatg	1320
catcaactcc tgagacattt tcaaaaggac gcaaaagtgc tatttcagaa ttggggaatt	1380
gaaccattg ataatgtcat ggggatgatc ggaatattac ctgacatgac tcccagcaca	1440
gaaatgtcac tgagaggagt aagagttagt aaaatgggag tggatgaata ttccagcact	1500
gagagagtag ttgtaagtat tgaccgtttc ttaagggttc gagatcagcg ggggaacgta	1560
ctcttatctc ccgaagaggt cagcgaaacc cagggaacag agaaattgac aataacatat	1620
tcatcatcaa tgatgtggga aatcaacggt cctgagtcag tgcttgtaa cacctatcag	1680
tggatcatca gaaactggga gactgtgaag attcaatggt ctcaagaccc cagcatgctg	1740
tacaataaga tggagtttga accgttccaa tccttggtac ccaagctgc cagaggtcaa	1800
tacagtggat ttgtgagaac attattccag caaatgcgtg acgtactggg gacatttgat	1860

actgtccaga taataaagct gctaccattt gcagcagccc caccgaagca gagcagaatg	1920
cagttttctt ctctaactgt gaatgtgaga ggctcaggaa tgagaatact cgtaaggggc	1980
aattcccctg tgttcaacta caataaggca accaaaaggc ttaccgtcct tggaaaggac	2040
gcaggtgcat taacagagga tccggatgaa gggacagccg gagtggagtc tgcagtactg	2100
aggggattct taattttagg caaggaggac aaaaggatg gaccagcatt gagcatcaat	2160
gaactgagca atcttgcgaa gggggagaaa gctaattgtgc tgatagggca aggtgacgtg	2220
gtgttggtta tgaaacgaaa acgggactct agcatactta ctgacagcca gacagcgacc	2280
aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaattgttt aaaaacgacc ttgtttctac	2340
t	2341

<210> 9
 <211> 1767
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 9

agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt	60
cagccttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat gcaaacaact cgacagagca	120
ggttgacaca ataattgaaa agaacgtcac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa	180
gacacacaac gggaaactct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt tagagagatt	240
gtagtgtagc tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcctc aatgtgccgg	300
aatggtctta catagtggag aagatcaatc cagccaatga cctctgttac ccagggtatt	360
tcaacgacta tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt gagaaaattc	420
agatcatccc caaaagttct tggtcagaca tgaagcctca gcaggggtga gctcagcatg	480
tccataccag ggaaggctct ctttttttag aaatgtggtt tggcttatca aaaaggacaa	540
tgcatacca acaataaaga gaagttacaa taataccaac caagaagatc ttttggattt	600
gtgggggatt caccatccaa atgatgcggc agagcagaca aggctctatc aaaacccaac	660
tacctatatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa aaatagccac	720
tagatctaag gtaaacgggc aaagtggaag gatggagttc ttttggacaa ttttaaaacc	780
gaatgatgca ataaactttg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaaa atgcatacaa	840
aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtgag ttggaatatg gtaactgcaa	900
caccaagtgt caaactccaa taggggcgat aaactctagt atgccattcc acaacatcca	960

ES 2 675 771 T3

```

ccctctcacc atcggggaat gcccacaaata tgtgaaatca agcagattag tccttgctac 1020
tgggctcaga aatagccctc aaaccgagac ccgaggacta tttggagcta tagcaggttt 1080
tatagagggga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggtagcacc atagcaacga 1140
gcaggggagt gggtagcgtg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac 1200
caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggctg ttggaaggga 1260
atttaataac ttagaaagga gaatagaaaa tttaaacaag aagatggaag acggattcct 1320
agatgtctgg acttataatg ctgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga 1380
ctttcatgac tcaaattgtc agaaccctta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa 1440
tgcaaaggag cttggtaacg gttgtttcga gttctatcac agatgtgata atgaatgtat 1500
ggaaagtgtg agaaacggaa cgtatgacta cccgcagtat tcagaagaag caagattaaa 1560
aagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatagga acttaccaaa tactgtcaat 1620
ttattcaaca gtggcgagct ccctagcact ggcaatcatg gtggctggtc tatctttatg 1680
gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt 1740
gtagttaaaa acacccttgt ttctact 1767

```

<210> 10
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 10

ES 2 675 771 T3

```

agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct      60
gtatggtaat tggaatagtt agcttaaatgt tacaaattgg gaacatgatc tcaatatggg      120
tcagtcattc aattcagaca gggaatcaat gccaaagctga accaatcagc aataactaaat      180
ttcttactga gaaagctgtg gcttcagtaa cattagcggg caattcatct ctttgcccca      240
ttagcggatg ggctgtatac agtaaggaca acagtataag gatcgggttc aggggggatg      300
tgtttggtat aagagagccg ttcattctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt      360
tgactcaggg agccttgctg aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc      420
ctcacagaac attaatgagt tgtcctgtgg gtgaggctcc ctcccatat aactcaaggt      480
ttgagtctgt tgcttggtca gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg      540
gaatttctgg tccagacaat ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag      600
acaccatcaa gagttggagg aacaacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg      660

taaatggctc ttgctttact gtaatgactg atggaccaag tagtgggcag gcatcatata      720
agatcttcaa aatggaaaaa gggaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt      780
atcactatga ggagtgtcc tggtatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg      840
ataattggca tggctcaaat aggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa      900
taggatatat atgcagtgga gttttcggag acaatccacg cccaatgat ggaacaggta      960
gttgtgggtc ggtgttctct aacggggcat atggggtaaa agggttttca ttcaaatacg     1020
gcaatgggtg ttggatcggg agaaccaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga     1080
tttgggaccc aaatgggtgg actggaacgg acagtagctt ttcggtgaag caagatatcg     1140
tagcaataac tgatttgtca ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag     1200
gattagattg cataagacct tgtttctggg ttgagttaat cagagggcgg cctaaagaga     1260
gcacaatttg gaccagtggg agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtta     1320
gttgggtctt gccagacggt gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tttgttcaaa     1380
aaactccttg tttctact                                     1398

```

<210> 11
 <211> 1767
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<400> 11

ES 2 675 771 T3

```

agcaaaagca ggggttcaat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt      60
cagccttggt aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat gcaaacaact cgacagagca      120
ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa      180
gacacacaac gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctgattt taagagattg      240
tagtgtagct ggatggctcc tcggaaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtgccgga      300
atggtcttac atagtggaga aggccaaccc agccaatgac ctctgttacc caggggaattt      360
caacgactat gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca      420
gatcatcccc aaaagtctct ggtccgatca tgaagcctca tcaggggtga gctcagcatg      480
tccataccag ggaacgccct cctttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacaa      540
tacataccca acaataaaga gaagctacaa taataccaac caggaagatc ttttgatact      600
gtgggggatt catcattcta atgatgcggc agagcagaca aagctctatc aaaacccaac      660
cacctatatt tccgttggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa aaatagctac      720

tagatccaaa gtaaacgggc aaagtggag gatggatttc ttctggacaa ttttaaaacc      780
gaatgatgca atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa      840
aattgtcaag aaaggggact cagcaattgt taaaagtga gtggaatatg gtaactgcaa      900
caciaagtgt caaactccaa taggggcgat aaactctagt atgccattcc acaacataca      960
ccctctcacc atcggggaat gcccacaaata tgtgaaatca aacaaattag tccttgcgac     1020
tgggctcaga aatagtcctc aaaccgagac ccgaggacta tttggagcta tagcaggggtt     1080
tatagaggga ggatggcagg gaatggtaga tggttggtat gggtagacc atagcaatga     1140
gcaggggagt gggtagctg cagacaaaga atccactcaa aaggcaatag atggagtcac     1200
caataaggtc aactcgatca ttgacaaaat gaacactcag tttgaggccg ttggaaggga     1260
atttaataac ttagaaagga gaatagagaa tttaacaag aaaatggaag acggattcct     1320
agatgtctgg acttataatg ctgaacttct ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga     1380
cttccatgat tcaaatgtca agaaccttta cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa     1440
tgcaaaggag ctgggtaacg gttgtttcga gttctatcac aaatgtgata atgaatgtat     1500
ggaaagtgtg agaaacggaa cgtatgacta ccgcagtat tcagaagaag caagattaaa     1560
aagagaggaa ataagtggag taaaattgga atcaatagga acttaccaa tactgtcaat     1620
ttattcaaca gttgcgagtt ctctagcact ggcaatcatg gtggctggtc tatctttgtg     1680
gatgtgctcc aatgggtcgt tacaatgcag aatttgcatt taaatttgtg agttcagatt     1740
gtagttaaaa acacccttgt ttctact                                     1767

```

<210> 12
 <211> 1397
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nucleótido sintético

5

<400> 12

```

agcaaaagca ggagttcaaa atgaatccaa atcagaagat aataaccatt gggccaatct      60
gtatggtaat tggaatagtt agcttaatgt tacaaattgg gaacatgatc tcaatatggg      120
tcagtcattc aattcaaaca gggaatcaac accaagctga accaatcaga aatgctaatt      180
ttcttactga gaacgctgtg gcttcagtaa cattagcggg caattcatct ctttgccccg      240
ttagaggatg ggctgtacac agtaaagaca acagtataag gattgggtcc aagggggatg      300
ttttgttatt agagagccgt tcatctcatg ctcccacttg gaatgcagaa ctttcttttt      360
gactcagggg gccttactga atgacaagca ctccaatggg actgtcaaag acagaagccc      420
tcacagaaca ttaatgagtt gtctctgtgg tgaggtctcc tccccatata actcaaggtt      480
tgagtctgtt gcttgggtcag caagtgttg ccatgatggc accagttggt tgacaattgg      540
aatttctggc ccagacaatg gggctgtggc tgtattgaaa tacaatggca taataacaga      600
cactatcaag agttggagga acaacatact gagaactcaa gagtctgaat gtgcatgtgt      660
aaatggctct tgctttactg taatgactga tggaccaagt aatgggcagg catcatataa      720
gatcttcaaa atggaaaaag ggaaagtggg taaatcagtc gaattgaatg ctcttaatta      780
tcactatgag gaatgctcct gttatcctga tgctggcgaa atcacatgtg tgtgcagggg      840
taattggcat ggctcgaata ggccatgggt atctttcaat cagaatttgg agtatcaa      900
aggatatata tgcaagtggg ttttcggaga caatccacgc cccaatgatg gaacaggtag      960
ttgtgggtcca gtgtccccta acggggcata tgggataaaa gggttttcat ttaaatacgg      1020
caatgggtgt tggatcggaa gaaccaaag cactaattcc aggagcggct ttgaaatgat      1080
ttgggatcca aatgggtgga ctgaaacgga cagtaacttt tcggtgaaac aagatatagt      1140
agcaataact gattgggtcag gatatagcgg gagttttgtc cagcatccag aactgacagg      1200
attagattgc ataagacctt gcttctgggt tgagttaatc agagggcggc ccaaagagag      1260
cacaatttgg actagtggga gcagcatatc tttttgtggg gtaaatagtg acactgtgag      1320
ttggctcttg ccagacggtg ctgagttgcc attcaccatt gacaagtagt ttgttcaaaa      1380
aactccttgt ttctact                                     1397

```

10

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 13

ES 2 675 771 T3

Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

5 <210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 14

Thr Glu Thr Arg

1

15 <210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 15

Arg Arg Arg Lys
1

25 <210> 16
<211> 18
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
35 <400> 16

Asn Thr Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly
1 5 10 15

Ala Ile

40 <210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 17

Asn Thr Pro Gln Thr Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
1 5 10

50 <210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 675 771 T3

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 18

5

Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly

1

5

10

15

Ala Ile

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 19

Asn Ser Pro Gln Thr Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile

1

5

10

20

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 20

Asn Ser Pro Leu Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly

1

5

10

15

30

Ala Ile

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 21

Arg Arg Lys Lys

1

REIVINDICACIONES

1. Una composición antigénica de virus de la gripe reagrupado que comprende: segmentos génicos internos PB1, PB2, PA, M, NP y NS de una primera cepa del virus de la gripe A del subtipo H5N1 y genes de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA) de una segunda cepa del virus de la gripe A del subtipo H5N1, siendo la primera cepa y la segunda cepa cepas diferentes y en la que el gen de la HA está modificado en un sitio de escisión polibásico para producir un virus atenuado.
2. Una vacuna que comprende un virus de la gripe reagrupado, comprendiendo el virus: un polinucleótido que codifica la proteína de superficie HA y un polinucleótido que codifica la proteína de superficie NA, cada una de HA y NA derivadas de una primera cepa H5N1 de un subtipo del virus de la gripe A; un polinucleótido que codifica PB1; un polinucleótido que codifica PA, un polinucleótido que codifica PB2, un polinucleótido que codifica M, un polinucleótido que codifica NP, un polinucleótido que codifica NS, los polinucleótidos para PB1, PA, PB2, M, NP y NS derivados de una segunda cepa H5N1 de un subtipo del virus de la gripe A, en donde los polinucleótidos están unidos operativamente para permitir el empaquetamiento de los polinucleótidos reagrupadas en un virión y en donde dicho polinucleótido que codifica la HA está modificado en un sitio de escisión polibásico para producir un virus atenuado.
3. El virus de la composición antigénica de virus de la gripe reagrupado de la reivindicación 1, dicho virus de la gripe **caracterizado por** la capacidad de propagarse en cultivos de células de mamíferos, opcionalmente en donde las células de mamífero se seleccionan entre el grupo que consiste en células MRC-5, MRC-9, Lederle 130, hígado Chang y WI-38; U937, Vero, CV-1, IMR-90 e IMR-91, MDCK, MDBK, HEK, H9, CEM y HUT78 que expresa CD4, PerC6, células BHK-21, BSC y LLC-MK2, preferentemente en donde el cultivo de células de mamífero es un cultivo de células Vero.
4. La composición antigénica de la reivindicación 1 o la vacuna de la reivindicación 2, dichos genes de la HA y de la NA derivados de una cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05, A/Hong Kong/156/97, A/pavo/Turquía/01/2005, A/Anhui/1/05, A/Camboya/R0405050/2007, A/pollo/Nakorn-Patom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDk/JX/1653/05, MDk/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05, MDk/JX/1701/05, MDk/JX/2136/05, MDk/JX/2295/05, MDk/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5 85 8/04, Ck/Salatiga/BBVet-I/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/C58/05, A/pato criollo/Vietnam/453/2004, A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996.
5. La composición antigénica de la reivindicación 1 o la vacuna de la reivindicación 2, dichos genes internos derivados de una cepa H5N1 seleccionada entre el grupo que consiste en A/Vietnam/1203/2004, A/Hong Kong/213/03, A/Indonesia/5/05, A/Hong Kong/156/97, A/pavo/Turquía/01/2005, A/Anhui/1/05, A/Camboya/R0405050/2007, A/pollo/Nakorn-Patom/Tailandia/CU-K2/04, A/pollo/Vietnam/C58/04, A/codorniz/Vietnam/36/04, MDk/JX/1653/05, MDk/1657/JX/05, BH ganso/QH/65/05, similar a Gs/GD/1/96, Dk/Vietnam/568/05, Gs/GX/345/05, MDk/JX/1701/05, MDk/JX/2136/05, MDk/JX/2295/05, MDk/JX/2300/05, Dk/GX/351/04, Dk/GX/380/04, Dk/ST/4610/03, Ck/MYS/5858/04, Ck/Salatiga/BBVet-I/05 y Dk/VNM/S654/05, A/pollo/Vietnam/C58/05, A/pato criollo/Vietnam/453/2004, A/pato/Singapur/3/97, A/HK/156/97 y A/Hong Kong/156/1996.
6. La composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, en la que los segmentos génicos internos son de A/Vietnam/1203/2004.
7. La composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5 o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, en la que los genes de la HA y de la NA son de la cepa de H5N1 A/Vietnam/1203/2004 o de la cepa de H5N1 A/Indonesia/5/05.
8. La composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7 o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 o 7, en la que la modificación en el sitio de escisión polibásico es una mutación de **RERRRKKR (SEQ ID NO: 13) → TETR (SEQ ID NO: 14)**.
9. La composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8 que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7 u 8 que comprende adicionalmente un adyuvante.
11. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7, 8, 9 o 10, en donde la vacuna es una vacuna inactivada.
12. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 o 11 que comprende un contenido de HA de 1 µg a 100 µg de HA por dosis.

13. La composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9 o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 en una cantidad eficaz para proteger al sujeto frente a la infección por al menos una cepa de virus de la gripe H5N1, para su uso en el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria a al menos una cepa de virus de la gripe pandémico en un sujeto.
- 5
14. La composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9 o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 para su uso en la prevención de la infección de un sujeto por un virus de la gripe.
- 10
15. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la vacuna comprende un contenido de HA de 1 µg a 100 µg de HA por dosis, opcionalmente en donde la vacuna comprende un contenido de HA de 1 µg a 30 µg de HA por dosis, opcionalmente en donde la vacuna comprende de 1 µg a 15 µg de HA por dosis u opcionalmente en donde la vacuna comprende un contenido de HA de 10 ng a 1 µg de unidades de HA por dosis.
- 15
16. Un método de fabricación de una vacuna que comprende un virus de la gripe reagrupado que comprende, segmentos génicos internos PB1, PB2, PA, M, NP y NS de una cepa H5N1 del virus de la gripe A y los genes de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA) de una cepa H5N1 diferente del virus de la gripe A, los genes de la HA y de la NA derivados de la misma cepa vírica y el gen de la HA modificado en un sitio de escisión polibásico para producir un gen de la HA atenuado, comprendiendo el método transfectar el virus en células de mamífero *ex vivo* en
- 20
- condiciones adecuadas para el crecimiento del virus reagrupado, opcionalmente en el que las células de mamífero se seleccionan entre el grupo que consiste en células MRC-5, MRC-9, Lederle 130, hígado Chang y WI-38; U937, Vero, CV-1, IMR-90 y IMR-91, MDCK, MDBK, HEK, H9, CEM y HUT78 que expresan CD4, PerC6, BHK-21, y BSC y LLC-MK2 u opcionalmente en el que las células de mamífero son células Vero.

Figura 1

Secuencias génicas de nucleótidos para la cepa A/Vietnam/1203/04 modificada

RNC derivadas de A/Hong Kong/213/03 están subrayadas

HA

AGCAAAAGCAGGGGTTCAATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTCGAATA
GTCAGTCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACTCGACAG
AGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACT
GGAAAAGAAACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTT
GAGAGATTGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAAATGTGTGACGAATTCAT
CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTG
TTACCCAGGGGATTTCATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAAC
CATTTTGAGAAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCAT
TAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGGAAAGTCCTCTTTTTCAGAAATGTGG
TATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATAC
CAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAATGATCGGCAGA
GCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTA
AACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAATGGA
AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTA
ATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAAC
AATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATG
GGGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATATACACCTCTCACCATTGGGGAA
TGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGC
CCTCAAACCGAGACCCGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTATAGAGGGAGGA
TGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAG
TGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAA
GGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATT
TAACAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTT
AGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAATCTA
GACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCCTTACGACAAGTCCGACTACAGCTTAGG
GATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATG
AATGTATGGAAAGTGTAAGAAATGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAG
CGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAAATCAATAGGAATTTACCA
AATACTGTCAATTTATTCTACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCT
GGTCTATCCTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA
TTTGTGAGTTTCAGATTGTAGTTAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 1)

NA

AGCAAAAGCAGGAGTTCAAAATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAAT
CTGTATGGTAACTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAATA
TGGGTCAGTCATTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAATCAGCAATA
CTAATTTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAAATTAGCGGGCAATTCATCTCT
TTGCCCCATTAAACGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAACAGTATAAGGATCGGTTT
CAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGGAATG
CAGAACTTTCTTTTGACTCAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGAC
TGTCAAAGACAGAAGCCCTCAGAGAATTAATGAGTTGCTGTGGGTGAGGCTCC
CTCCCCATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCATGAT
GGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGT
ATTGAAATACAAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTG
AGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTG
ACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATCACATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAG
TGGTTAAATCAGTCGAATTGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTA
TCCTAATGCCGAGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCG
GCCATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAAATAGGATATATATGCAGTGGA
GTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCGGTGTCC
TCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCATTTAAATACGGCAATGGTGTCTGG
ATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTGAAATGATTGGGATCCA

AATGGGTGGACTGAAACGGACAGTAGCTTTTCAGTGAAACAAGATATCGTAGCAATA
ACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTGTCCAGCATCCAGAAGTGACAGGACTA
GATTGCATAAGACCTTGTCTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCAAAGAGAGC
ACAATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAAATAGTGACACTGTGG
GTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCCGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAGTTGTTC
AAAAAATCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 2)

M

AGCAAAAGCAGGTAGATGTTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGT
TCTCTTATCATCCCCTCAGGCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAACTTGAAGA
TGTCTTTCAGGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAG
ACCAATCCTGTACCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTG
CCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAA
TGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAGA
AATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTCGCACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTTGC
CAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGACTACGGAAGTGGCTTT
TGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTACAGCATCGGTCTCACAG
ACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGC
CAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCG
GAAGCCATGGAGATCGCTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAAT
TGGGACTCATCCTAACTCTAGTGTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTTGCAG
GCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTATTGTTGT
TGCCGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTCT
TCAAATGCATTTATCGTCGCCCTTAAATACGGTTTGAAGAGGGGCTGCTACGGCAG
GGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTACCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGAT
GTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATTGGAGTAAAAAATACCTTGTTTCTACT
(SEQ ID NO: 3)

NS

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGG
TAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGAACTGGGTGATG
CCCCATTCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAAC
ACTCTTGGTCTGGACATCGAAACAGCTACTCGCGCAGGAAAGCAGATAGTGGAGCG
GATTCTGGAGGGGAGTCTGATAAGGCACTTAAATGCCGGCTTCACGCTACCTAAC
TGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAA
AGTGGCAGGTTCCCTTTGCATCAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAACCATCAT
ATTGAAAGCAAACCTTCAGTGTGATTTTGTACCGGTTGGAAACCCTAATACTACTTAGA
GCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATTACCTTCTCTTCCA
GGACATACTGGTGAGGATGTCAAAATGCAATTGGCGTCTCATCGAGGACTTGAA
TGGAATGATAACACAGTTCGAGTCACTGAAACTATACAGAGATTTCGCTTGGAGAAAC
AGTGATGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTCCAAATCAGAAACGGTAAATGGCGAGA
ACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTAAGACATAG
ATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACATA
CTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAA
AAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 4)

NP

AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACCGAGTGACATCAGCATCATGGCGTCTCAA
GGCACCAAACGATCTTATGAACAGATGGAACTGGTGGGGAACGCCAGAATGCTACT
GAGATCAGGGCATCTGTTGGAAGAATGGTTAGTGGCATTGGGAGGTTCTACATACAG
ATGTGCACAGAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATA
ACAATAGAGAGAATGGTACTCTCTGCATTTGATGAAAGAAGGAACAGATACCTGGAA
GAACACCCCACTGCGGGAAGGACCCGAAGAAGACTGGAGGTCCAATTTATCGGAG
GAGAGACGGGAATGGGTGAGAGAGCTAATTCTGTACGACAAAGAGGAGATCAGGA
GGATTTGGCGTCAAGCGAACCAATGGAGAGGACGCAACTGCTGGTCTTACCCACCTG
ATGATATGGCATTCCAATCTAAATGATGCCACATATCAGAGAACGAGAGCTCTCGTG
CGTACTGGAATGGACCAAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGGTCAACTCTCCCGAG

Figura 1 (continuación)

GAGATCTGGAGCTGCCGGTGCAGCAGTAAAGGGGGTAGGGACAATGGTGATGGAG
CTGATTCGGATGATAAAACGAGGGATCAACGACCGGAATTTCTGGAGAGGCGAAAAT
GGAAGAAGAACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTC
CAAACAGCAGCACAAAGAGCAATGATGGATCAAGTGCAGAGAGCAGAAATCCTGG
GAATGCTGAAATTTGAAGATCTCATTTTTCTGGCACGGTCTGCACTCATCCTGAGAGG
ATCAGTGGCCCATAGTCTGCTTGCTTGCTTGCTGTGTGTACGGACTTGCACTGGCCAG
TGGATATGACTTTGAGAGAGAAGGGTACTCTCTGGTTGGAATAGATCCTTTCCGCCT
GCTTCAAACAGCCAGGTCTTTAGTCTCATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAG
AGTCAATTAGTGTGGATGGCATGCCACTCTGCAGCATTGAGGACCTTAGAGTCTCA
AGTTTCATCAGAGGGACAGAGTGGTCCCAAGAGGACAGCTATCCACCAGAGGGGT
TCAAATTGCTTCAAATGAGAACATGGAGGCAATGGACTCCAACACTCTTGAAGTGGAG
AAGCAGATATTGGGCTATAAGAACCAGAAGCGGAGGAAACACCAACCAGCAGAGGG
CATCTGCAGGACAGATCAGCGTTTCAAGCCACTTTCTCGGTCCAGAGAAACCTTCCCT
TCGAAAGAGCGACCATTATGGCAGCATTACAGGAAATACTGAGGGCAGAACGTCTG
ACATGAGGACTGAAATCATAAGAATGATGGAAAGTGCAGACCAGAAAGTGTGTCAT
TCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGT
GCCTTCCCTTGACATGAATAATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAG
TATGACAATTAAGAAAAATACCCTTGTTCTACT (SEQ ID NO: 5)

PA

AGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCA
ATGATTGTGAGCTTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATC
GAAACGAAACAAGTTTGTGCAATATGCACACACTTGAGGTCGTGTTTCATGTATTCCG
ATTTTCACTTTATTGATGAACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAA
TGCATTATTGAAACACCGATTGAAATAATTGAAGGAAGAGACCGAACGATGGCCTG
GACTGTGGTGAATAGTATCTGCAACACCACAGGAGTTGAGAAACCTAAATTTCTCCC
AGATTGTATGACTACAAAGAGAACCGATTATCGAAATTGGAGTGACACGGAGGGA
AGTTTCATACATACTATCTGGAGAAAGCCAACAAGATAAAATCCGAGGAGACACATATT
ACATATTTCTCATTACAGGGGAGGAAATGGCCACCAGCGGACTACACCTTGAT
GAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAACCAAGGCTGTTCAACATAAGGCAGGAAATGGC
CAGTAGGGGTCTATGGGATTCCTTTCTGTCATCCGAGAGAGGCGAAGAGACAATTGA
AGAAAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAGACTTGCAAGCCAAAGTCTCCCAAC
GAACCTTCTCCAGCCTTGAAAACCTTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGCAACCGAACGG
CTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAATGTAGAAATTGAGCC
ATTTTGAAGACAACGCCACGCCCTCTCAGACTACCTGATGGGCTCCTTGCTCTCA
GCGGTGCAAGTTCTTGCTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCGAAGACCCGAGTCA
TGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTTCGG
CTGGAAGAGCCCCAATCGTGAACCCACATGAAAAAGGTATAAACCCCAATTACCT
CCTGGCTTGGAAGCAAGTGCTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAAAT
CCCCAAAAACAAGAACATGAAAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTCGGTGAGAA
CATGGCACCCAGAGAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATCTAAGACA
GTATGACAGTGATGAACCAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATT
CAACAAGGCATGTGAATTGACAGATTGATTTGGATTGAACTCGATGAAATAGGAGA
AGACGTAGCTCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAATATTTTACAGCGGA
AGTATCCCATTTGAGGGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGACATAAACACAGC
CCTGTTGAATGCATCCTGTGAGCCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGC
AAATGCAGAACCAAAGAAGGAAGACGGAATACTAATCTGTATGGATTCAATTATAAAG
GGAGATCCCACTTGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTTGTGAGTATGGAATTCTC
TCTTACTGATCCGAGGCTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGTCCTCGAGAT
AGGAGACATGCTCCTCCGACTGCAGTAGGCCAAGTTTCGAGGCCCATGTTCTCTGT
ATGTAAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAAATGAAATGGGGCATGGAATGAGGC
GATGCCTTCTTCAATCCCTTCAACAAATTGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTCTGT
CAAAGAGAAGGACATGACCAAAGAATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCGATT
GGAGAGTCCCCAAGGGAGTGGAGGAAGGCTCCATCGGAAAGGTGTGCAGAACCTT
GCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTTTC
AGCTGAATCAAGAAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACC

Figura 1 (continuación)

TTGGGACCTTCGATCTTGGAGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAACGA
TCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCCTTCCCTCGCACATGCACTGAAA
TAGTTGTGGCAATGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAGTACCTTGTCTTA
CT (SEQ ID NO: 6)

PB1

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTGAAAG
TACCAGTGCAAAATGCTATAAGTACCACCTTCCCTTATACTGGAGACCCTCCATACAG
CCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTC
AGAAAAGGGGAAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCAACTCAACCCGA
TTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAGCCCAGTGGGTACGCACAAACAGATTGTG
TATTGGAAGCAATGGCTTTCTTGAAGAATCCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGT
GTCTTGAAACGATGGAATTTGTTCAACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCCAAGGTC
GCCAGACCTATGACTGGACATTGAATAGAAACCAACCGGTGCAACTGCTTTGGCCA
ACACTATAGAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAATGAATCGGGACGGCTAA
TAGATTTCCCTCAAGGATGTGATGGAGTCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAA
CACATTTCCAGAGAAAGAGAAGGGTGAGGGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACAC
AAAGAACAATAGGGAAGAAAAAACAAAGGCTGAACAAAAAGAGCTACCTGATAAGAG
CACTGACACTGAACACAATGACAAAAAGATGCAGAAAGAGGCAAATTGAAGAGGCGAG
CGATTGCAACACCCGGAATGCAATCAGAGGATTCTGTGTACTTTGTTGAAACACTAG
CGAGGATATCTGTGAGAACTTGAGCAATCTGGACTCCAGTCCGAGGGGAATGAG
AAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTCGTGAGGAAGATGATGACTAACTCACAAGATACT
GAACTCTCCTTTACAATTACTGGAGACAATACCAAATGGAATGAGAATCAGAATCCTA
GGATGTTTTCTGGCAATGATAACGTACATCACAAGGAACCAGCCAGAATGGTTTCGGA
ATGTCTTAAGCATAGCTCCTATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTAGGAAAAGG
ATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAACACAAAATACCAGCAGAAATGCTT
GCAAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAAATAAG
GCTCTATTAAATAGATGGTACAGCCTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTT
CAACATGCTGAGTACAGTCTTAGGAGTTTCAATCCTGAATCTTGGACAGAAAAGGTA
CACCAAAACCACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGATGATTTCTGCTCTCAT
CGTAAATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGAC
TTGTAAACTAGTTGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGG
ACATTTGAATTCACGAGCTTTTCTACCGCTATGGATTTGTAGCCAATTTTCAGTATGG
AGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGCATTGGTG
TTACACTACATAAAAAACAATATGATAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGAT
GGCTCTTCAGTTATTCATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGA
TACGCAAAATCCAAACAAGGAGATCATTCGAGCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAAACCC
GTTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTCAGATGGAGGACCAAATCTATACAATATCCGAA
ACCTCCATATTCCTGAAGTCTGCTTAAAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGG
CAGACTGTGTAATCCTCTGAATCCATTCGTGAGCCATAAGGAAATTGAATCTGTCAAC
AATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGGCCAAGAGTATGGAATATGATGCCGTT
GCAACTACACATTTCATGGATTCTTAAAAGGAACCGTTCCATTCTCAATACGAGTCAAA
GGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGTGCAATCTATTTCGAGAAAT
TCTTCCCCAGCAGTTTCATATCGGAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCA
TGGTGTCTAGGGCCCGAATTGACGCACGAATCGATTTGAGTCTGGAAGGATTAAGA
AAGAAGAGTTTGCCGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGC
AAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCTGTAAGAAAATGCCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO: 7)

PB2

AGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATGGAGAGGATAAAAGAATTACGAGATCTAA
TGTCACAGTCCCGCACTCGCGAGATACTAACAAAAACCACTGTGGACCATATGGCCA
TAATCAAGAAATACACATCAGGAAGACAAGAGAAGAACCCCTGCTCTCAGAATGAAAT
GGATGATGGCAATGAAATATCCAATCACAGCGGACAAGAGAATAATAGAGATGATTC
CTGAAAGGAATGAACAAGGGCAGACGCTCTGGAGCAAGACAAATGATGCTGGATCG
GACAGGGTGATGGTGTCTCCCTAGCTGTAACCTGGTGGAAATAGGAATGGGCCGGC

Figura 1 (continuación)

GACAAGTGCAGTTCATTATCCAAAGGTTTACAAAACATACTTTGAGAAGGTTGAAAGA
 TTTAAACATGGAACCTTCGGTCCCGTTCATTTCCGAAACCAGGTTAAATACGCCGC
 CGAGTTGATATAAATCCTGGCCATGCAGATCTCAGTGCTAAAGAAGCACAAGATGTC
 ATCATGGAGGTCGTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCTAGAATATTGACATCAGAGTCG
 CAATTGACAATAACGAAAGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAAGATTGTAAGATTGCTCCC
 TTAATGGTTGCATACATGTTGGAAAGGGAACGGTCCGCAAGACCAGATTCTTACCG
 GTAGCAGGCGGAACAAGTAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTGACTCAAGGGACC
 TGCTGGGAACAGATGTACACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAATGACGATGTTGACCA
 GAGTTTGATCATTGCTGCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACAGTATCAGCGGATCC
 ACTGGCATCACTGCTGGAGATGTGTACAGCACACAAATTGGTGGGATAAGGATGGT
 GGACATCCTTAGGCAAAATCCAACAGGGAACAAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGC
 AATGGGTCTTAGGATCAGTTCTTCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAGAACA
 AGTGGATCATCCGTCAAGAAGGAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTG
 AAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTACAATGGTTGGGCGGAGGGCAAC
 AGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTGAGTTGATAGTAGTGAAGAGA
 CCAACAATCAATCGCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTG
 CATGATAAAGGCAGTCCGAGGCGATCTGAATTTCTGTAACAGAGCAAACCAAAGATT
 AAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAGGACGCAAAGTGCTATTTTCAG
 AATTGGGGAATTGAACCCATTGATAATGTTCATGGGGATGATCGGAATATTACCTGACA
 TGACTCCCAGCACAGAAATGTCACTGAGAGGAGTAAGAGTTAGTAAAATGGGAGTGG
 ATGAATATTTCCAGCACTGAGAGAGTAGTTGTAAGTATTGACCGTTTCTTAAGGGTTTCG
 AGATCAGCGGGGGAACGTACTCTTATCTCCCGAAGAGGTCAGCGAAACCCAGGGAA
 CAGAGAAATTGACAATAACATATTATCATCAATGATGTGGGAAATCAACGGTCTCTGA
 GTCAGTGCTTGTAAACACCTATCAGTGGATCATCAGAACTGGGAGACTGTGAAGAT
 TCAATGGTCTCAAGACCCACGATGCTGTACAATAAGATGGAGTTTGAACCGTTCCA
 ATCCTTGGTACCCAAAGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTGTTGAGAACATTATTC
 CAGCAAATGCGTGACGTACTGGGGACATTTGATACTGTCCAGATAATAAAGCTGCTA
 CCATTTGCAGCAGCCCCACCGAAGCAGAGCAGAAATGCAGTTTCTTCTTAACGTG
 AATGTGAGAGGCTCAGGAATGAGAATACTCGTAAGGGGCAATTCCCCTGTGTTCAAC
 TACAATAAGGCAACCAAAGGCTTACCGTCTTGGAAAGGACGCGAGGTGCATTAACA
 GAGGATCCGGATGAAGGGACAGCCGGAGTGGAGTCTGCAGTACTGAGGGGATTCTT
 AATTTTAGGCAAGGAGGACAAAAGGTATGGACCAGCATTGAGCATCAATGAACTGAG
 CAATCTTGCGAAGGGGGAGAAAGCTAATGTGCTGATAGGGCAAGGTGACGTGGTGT
 TGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCA
 AAAGAATTGCGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATTGTTTAAAAACGACCTTGTTCCTA
 CT (SEQ ID NO: 8)

Figura 1 (continuación)

FIGURA 2**Secuencias génicas de la cepa Indonesia****HA**

AGCAAAAGCAGGGGTTCAATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTGTCAATA
 GTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAG
 AGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACT
 GGAAAAGAAACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTT
 GAGAGATTGTAGCGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAAATTCAT
 CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTG
 TTACCCAGGGGATTTCATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAAC
 CATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCAT
 TAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAGTCTCTCTTTTTCAGAAATGTGG
 TATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATAC
 CAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGA
 GCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTA
 AACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAATGGA
 AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTA
 ATGGAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAAC
 AATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAATCCAATG
 GGGCCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATTGGGGAA
 TGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGC
 CCTCAAACCGAGACCCGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGA
 TGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAG
 TGGGTACCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAA
 GGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATT
 TAACAACCTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTC
 AGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGAAAATGAGAGAACCTTA
 GACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGG
 GATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATG
 AATGTATGGAAGTGTAAAGAAATGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAG
 CGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAATTTGGAATCAATAGGAATTTACCA
 AATACTGTCAATTTATTCTACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCT
 GGTCATTCCTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA
 TTTGTGAGTTTCAATTTAGTTTAAAAACACCCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO: 1)

NA

AGCAAAAGCAGGAGTTCAAAATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAAT
 CTGTATGGTAAGTGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATGGGAACATGATCTCAATA
 TGGGTGAGTCATTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAATCAGCAATA
 CTAATTTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAAATTAGCGGGCAATTCATCTCT
 TTGCCCCATTAACGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAACAGTATAAGGATCGGTTT
 CAAGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGGAAATG
 CAGAACCTTCTTTTGAAGTCTAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGAC
 TGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCTGTGGGTGAGGCTCC
 CTCCCCATATAAATCAAGGTTTGAAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGTGCCCATGAT
 GGCACCAGTTGGTTGACGATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGT
 ATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTG
 AGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTG
 ACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATCACATAAGATCTTCAAAATGGAAAAGGGAAAG
 TGGTTAAATCAGTCGAATTTGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTA
 TCCTAATGCCGGAGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCG
 GCCATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGTGG
 GTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCGGTGTCC
 TCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCATTTAAATACGGCAATGGTGTCTGG
 ATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCCA
 AATGGGTGGACTGAAACGGACAGTAGCTTTTCAGTGAACAAGATATCGTAGCAATA
 ACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTGTCCAGCATCCAGAAGTACAGGACTA
 GATTGCATAAGACCTTGTCTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCAAAGAGAGC
 ACAATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTGTGGTGTAATAGTGACACTGTGG

GTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCCGAGTTGCCATTACCATTTGACAAGTAGTTTGTTC
AAAAAACTCCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO: 2)

M

AGCAAAAAGCAGGTAGATGTTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCAAAACGTACGT
TCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAACTTGAAGA
TGTCTTTGCAGGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAG
ACCAATCCTGTACCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTG
CCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAA
TGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAGA
AATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTCGCACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTTGC
CAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGACTACGGAAGTGGCTTT
TGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTACAGCATCGGTCTCACAG
ACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGC
CAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCG
GAAGCCATGGAGATCGCTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAAGCAATGAGGACAAT
TGGGACTCATCCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAATAATTTGCAG
GCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTATTGTTGT
TGCCGCAAAATATCATTGGGATCTTGCCTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTCT
TCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAGAGGGCCTGTACGGCAG
GGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTACCGGCAGGAACAGCAGAGTGTGTGGAT
GTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATTGGAGTAAAAAACTACCTTGTCTTCTACT
 (SEQ ID NO: 3)

NS

AGCAAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGG
TAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTCAGACCAAGAAGTGGGTGATG
CCCCATTCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAAC
ACTCTTGGTCTGGACATCGAAACAGCTACTCGCGCAGGAAAGCAGATAGTGGAGCG
GATTCTGGAGGGGAGTCTGATAAGGCACTTAAATGCCGGCTTCACGCTACCTAAC
TGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAA
AGTGGCAGGTTCCCTTTGCATCAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAACCATCAT
ATTGAAAGCAAACCTTCAGTGTGATTTTGGACCGTTGGAAACCCTAATACTACTTAGA
GCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATTACCTTCTCTTCCA
GGACATACCTGGTGAGGATGTCAAAATGCAATTGGCGTCCCTCATCGGAGGACTTGAA
TGGAATGATAACACAGTTCGAGTCACTGAACTATACAGAGATTCCGTTGGAGAAAC
AGTGATGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTCCAAATCAGAAACGGTAAATGGCGAGA
ACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTAAGACATAG
ATTGAAATACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACATA
CTGCTTGAAGTGAGCAAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAA
AAACACCCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO: 4)

NP

AGCAAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACCGAGTGACATCAGCATCATGGCGTCTCAA
GGCACCAAACGATCTTATGAACAGATGGAACTGGTGGGGAACGCCAGAATGCTACT
GAGATCAGGGCATCTGTTGGAAGAATGGTTAGTGGCATTGGGAGGTCTACATACAG
ATGTGCACAGAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATA
ACAATAGAGAGAATGGTACTCTCTGCATTTGATGAAAGAAGGAACAGATACCTGGAA
GAACACCCAGTGCGGGAAAGGACCCGAAGAAGACTGGAGGTCCAATTTATCGGAG
GAGAGACGGGAAATGGGTGAGAGAGCTAATTCTGTACGACAAAGAGGAGATCAGGA
GGATTTGGCGTCAAGCGAACAATGGAGAGGACGCAACTGCTGGTCTTACCCACCTG
ATGATATGGCATTCCAATCTAAATGATGCCACATATCAGAGAACGAGAGCTCTCGTG
CGTACTGGAATGGACCCAAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGGTCAACTCTCCCGAG
GAGATCTGGAGCTGCCGGTGCAGCAGTAAAGGGGTAGGGACAATGGTGATGGAG
CTGATTCGGATGATAAAACGAGGGATCAACGACCGGAATTTCTGGAGAGGCGAAAAAT
GGAAGAAGAACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTC

Figura 2 (continuación)

CAAACAGCAGCACAAAGAGCAATGATGGATCAAGTGCGAGAGAGCAGAAATCCTGG
GAATGCTGAAATGAAGATCTCATTTTTCTGGCACGGTCTGCACTCATCTGAGAGG
ATCAGTGGCCCATAGTCTCTGCTTGCCTGCTTGTGTGTACGGAAGTGCAGTGGCCAG
TGGATATGACTTTGAGAGAGAAGGGTACTCTCTGGTTGGAATAGATCCTTTCCGCCT
GCTTCAAAACAGCCAGGTCTTTAGTCTCATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAG
AGTCAATTAGTGTGGATGGCATGCCACTCTGCAGCATTTGAGGACCTTAGAGTCTCA
AGTTTCATCAGAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAGCTATCCACCAGAGGGGT
TCAAATTGCTTCAAATGAGAACATGGAGGCAATGGACTCCAACACTCTTGAAGTGA
AAGCAGATATTGGGCTATAAGAACCAGAAGCGGAGGAAACCAACCAGCAGAGGG
CATCTGCAGGACAGATCAGCGTTCAGCCACTTTCTCGGTCCAGAGAACTTCCCT
TCGAAAGAGCGACCATTTATGGCAGCATTTACAGGAAATACTGAGGGCAGAACGTCG
ACATGAGGACTGAAATCATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCTAT
TCCAGGGGCGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGT
GCCTTCCTTTGACATGAATAATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAG
TATGACAATTAAGAAAAATACCCCTTGTCTACT (SEQ ID NO: 5)

PA

AGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCA
ATGATTGTCGAGCTTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATC
GAAACGAACAAGTTTGCTGCAATATGCACACACTTGAGAGGTCTGTTTCATGTATTCCG
ATTTTCACTTTATTGATGAACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAA
TGCAATTATTGAAACACCGATTGAAATAATTGAAGGAAGAGACCGAACGATGGCCTG
GACTGTGGTGAATAGTATCTGCAACACCACAGGAGTTGAGAAACCTAAATTTCTCCC
AGATTTGTATGACTACAAAGAGAACCAGATTTCATCGAAATTGGAGTGACACGGAGGGA
AGTTTACATATACTATCTGGAGAAAGCCAACAAGATAAAATCCGAGGAGACACATATT
CACATATTCTCATTCACAGGGGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTACACCTTGAT
GAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAAACACAGGCTGTTACCCATAAGGCAGGAAATGGC
CAGTAGGGGTCTATGGGATTCCTTTTCGTCAATCCGAGAGAGGCGAAGAGACAATTGA
AGAAAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAGACTTGCAAGCAAAAGTCTCCCACC
GAACCTCTCCAGCCTTGAAACCTTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGCAACCGAACGG
CTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAATGCTAGAATTGAGCC
ATTTTGAAGACAACGCCACGCCCTCTCAGACTACCTGATGGGCCTCCTTGCTCTCA
GCGGTGCAAGTTCTTGCTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCGAAGACCCGAGTCA
TGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTCGG
CTGGAAGAGCCCCAACATCGTGAAACCACATGAAAAAGGTATAAACCCCAATTACCT
CCTGGCTTGGAAGCAAGTGTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAATGAGGAGAAAAAT
CCCAAAAACAAAGACATGAAAAAACCAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTCGGTGAGAA
CATGGCACCAGAGAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATCTAAGACA
GTATGACAGTGATGAACAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATT
CAACAAGGCATGTGAATTGACAGATTGATTTGGATTGAACTCGATGAAATAGGAGA
AGACGTAGCTCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAAGTATTTTACAGCGGA
AGTATCCCATTGCAAGGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGATATAAACACAGC
CCTGTTGAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGC
AAATGCAGAACCAGAAAGGAAGACGGAAGAACTAATCTGTATGGATTCAATATAAAG
GGAGATCCCACTTGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTTGTGAGTATGGAATTCTC
TCTTACTGATCCGAGGCTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGTCTCGAGAT
AGGAGACATGCTCCTCCGGACTGCAGTAGGCCAAGTTTCGAGGCCCATGTTTCTGT
ATGTAAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAAATGAAATGGGGCATGGAATGAGGC
GATGCCTTCTTCAATCCCTTCAACAAATTGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTCTGT
CAAAGAGAAGGACATGACCAAGAATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCGATT
GGAGAGTCCCCAAGGGAGTGGAGGAAGGCTCCATCGGAAAGGTGTGCAGAACCTT
GCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTTTC
AGCTGAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACC
TGGGACCTTCGATCTTGGAGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAACGA
TCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCCTTCTCGCACATGCACTGAAA
TAGTTGTGGCAATGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAGTACCTTGTCTCTA
CT (SEQ ID NO: 6)

Figura 2 (continuación)

PB1

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTGAAAG
TACCAAGTGCAAAATGCTATAAGTACCACCTTCCCTTATACTGGAGACCCTCCATACAG
CCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTC
AGAAAAGGGGAAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCACTCAACCCGA
TTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAGCCCAGTGGGTACGCACAAACAGATTGTG
TATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGT
GTCTTGAAACGATGGAAATGTTCACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCCAAGGTC
GCCAGACCTATGACTGGACATTGAATAGAAACCAACCGGCTGCAACTGCTTTGGCCA
ACACTATAGAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAATGAATCGGGACGGCTAA
TAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAGTCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAA
CACAATTTCCAGAGAAAGAGAAGGGTGAGGGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACAC
AAAGAACAATAGGGGAAGAAAAACAAGGCTGAACAAAAAGAGCTACCTGATAAGAG
CACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAGAGGCAAATTGAAGAGGCGAG
CGATTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCGTGTACTTTGTTGAAACACTAG
CGAGGAGTATCTGTGAGAACTTGAGCAATCTGGACTCCCAGTCCGAGGGAATGAG
AAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTCGTGAGGAAGATGATGACTAACTCACAAGATACT
GAACCTCTCCTTTACAAATTACTGGAGACAATACCAATGGGAATGAGAATCAGAATCCTA
GGATGTTTCTGGCAATGATAACGTACATCACAAGGAACCCAGCCAGAATGGTTTTCGGA
ATGTCTTAAGCATAGCTCCTATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTAGGAAAAGG
ATACATGTTGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAACACAAATACCAGCAGAAATGCTT
GCAAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAATAAG
GCCTCTATTAATAGATGGTACAGCCTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTT
CAACATGCTGAGTACAGTCCCTAGGAGTTTCAATCCTGAATCTTGGACAGAAAAGGTA
CACCAAAACCACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGATGATTTGCTCTCAT
CGTAAATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGAC
TTGTAAACTAGTTGGAATCAATATGAGCAAGAAGAGTCTTACATAAATCGGACAGGG
ACATTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCGCTATGGATTTGTAGCCAATTTCAATATG
AGCTGCCAGTTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGCATTGGTG
TTACAGTGATAAAAAACAATATGATAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGAT
GGCTCTTCAGTTATTCATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGA
TACGCAAAATCCAAACAAGGAGATCATTCGAGCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAAACCC
GTTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTTGAGATGGAGGACCAAAATCTATACAATATCCGAA
ACCTCCATATTCTGAGTCTGCTTAAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGG
CAGACTGTGTAATCCTCTGAATCCATTGTCAGCCATAAGGAAATGAATCTGTCAAC
AATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGGCCAAGAGTATGGAATATGATGCGGTT
GCAACTACACATTTCATGGATTCTTAAAGGAACCGTTCCATTCTCAATACGAGTCAAA
GGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCAATCTATTGAGAAAT
TCTTCCCCAGCAGTTCATATCGGAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCA
TGGTGTCTAGGGCCGAATTGACGCACGAATCGATTTGAGTCTGGAAGGATTAAGA
AAGAAGAGTTTGCCGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAAGTCAAGCGC
AAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCGTGAAAAAATGCCTTGTCTTACT (SEQ ID NO: 7)

PB2

AGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATGGAGAGGATAAAAGAATTACGAGATCTAA
TGTCACAGTCCCGCACTCGCGAGATACTAACAAAAACCACTGTGGACCATATGGCCA
TAATCAAGAAATACACATCAGGAAGACAAGAGAAGAACCCTGCTCTCAGAAATGAAAT
GGATGATGGCAATGAAATATCCAATCACAGCGGACAAGAGAATAATAGAGATGATTC
CTGAAAGGAATGAACAAGGGCAGACGCTCTGGAGCAAGACAAATGATGCTGGATCG
GACAGGGTGATGGTGTCTCCCTAGCTGTAACCTGGTGGAATAGGAATGGGCCGGC
GACAAGTGCAAGTTCATTATCCAAAGGTTTACAAAACATACTTTGAGAAGGTTGAAAGA
TTAAAACATGGAAACCTTCGGTCCCGTTTCAATTTCCGAAACAGGTTAAAATACGCCGC
CGAGTTGATATAAATCCTGGCCATGCAGATCTCAGTGCTAAAGAAGCACAAGATGTC
ATCATGGAGGTCGTTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCTAGAATATTGACATCAGAGTCG
CAATTGACAATAACGAAAGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAAGATTGTAAGATTGCTCCC
TTAATGGTTGCATACATGTTGGAAAGGGAACCTGGTCCGCAAGACCAGATTCCCTACCG
GTAGCAGGCGGAACAAGTAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTGACTCAAGGGACC
TGCTGGGAACAGATGTACACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAATGACGATGTTGACCA

Figura 2 (continuación)

GAGTTTGATCATTGCTGCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACAGTATCAGCGGATCC
 ACTGGCATCACTGCTGGAGATGTGTCACAGCACACAAATTGGTGGGATAAGGATGGT
 GGACATCCTTAGGCAAAATCCAAGTGAAGGAACAAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGC
 AATGGGTCTTAGGATCAGTTCTTCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAGAACA
 AGTGGATCATCCGTCAAGAAGGAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTG
 AAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTCACAAATGGTTGGGCGGAGGGCAAC
 AGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTGAGTTGATAGTAAGTGGAAGAGA
 CCAACAATCAATCGCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTG
 CATGATAAAGGCAGTCCGAGGCGATCTGAATTTTCGTAAACAGAGCAAACCAAAGATT
 AAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAGGACGCAAAAGTGCTATTTTCAG
 AATTGGGGGAATTGAACCCATTGATAATGTCATGGGGATGATCGGAATATTACCTGACA
 TGACTCCCAGCACAGAAATGTCCTGAGAGGAGTAAGAGTTAGTAAAATGGGAGTGG
 ATGAATATTCCAGCACTGAGAGAGTAGTTGTAAGTATTGACCGTTTCTTAAGGGTTTCG
 AGATCAGCGGGGGAACGTACTCTTATCTCCCGAAGAGGTCAGCGAAACCCAGGGAA
 CAGAGAAATTGACAATAACATATTTCATCATCAATGATGTGGGAAATCAACGGTCTCTGA
 GTCAGTGCTTGTTAACACCTATCAGTGGATCATCAGAACTGGGAGACTGTGAAGAT
 TCAATGGTCTCAAGACCCACGATGCTGTACAATAAGATGGAGTTTGAACCGTTCCA
 ATCCTTGGTACCCAAAGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTTGTGAGAACATTATTC
 CAGCAAATGCGTGACGTACTGGGGACATTTGATACTGTCCAGATAATAAAGCTGCTA
 CCATTTGCAGCAGCCCCACCGAAGCAGAGCAGAATGCAGTTTCTTCTCTAACTGTG
 AATGTGAGAGGCTCAGGAATGAGAATACTCGTAAGGGGCAATTCCCCTGTGTTCAAC
 TACAATAAGGCAACCAAAGGCTTACCGTCTTGGAAAGGACGCAGGTGCATTAACA
 GAGGATCCGGATGAAGGGACAGCCGGAGTGGAGTCTGCAGTACTGAGGGGATTCTT
 AATTTTAGGCAAGGAGGACAAAAGGTATGGACCAGCATTGAGCATCAATGAACTGAG
 CAATCTTGCGAAGGGGGAGAAAGCTAATGTGCTGATAGGGCAAGGTGACGTGGTGT
 TGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCA
 AAAGAATTGCGATGGCCATCAATTAGTGTGCGAATTGTTTAAAAACGACCTTGTTCCTA
CT (SEQ ID NO: 8)

Figura 2 (continuación)

FIGURA 3**Secuencias génicas de la cepa atenuada A/Pavo/Turquía/1/05****HA**

AGCAAAAGCAGGGGTTCAATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATA
 GTCAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAG
 AGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTCACGTGTTACACATGCCCAAGACATACT
 GGAAAAGACACACAACGGGAACTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTT
 AGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCCT
 CAATGTGCCGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGATCAATCCAGCCAATGACCTCTG
 TTACCCAGGGTATTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAAC
 CATTTTGAGAAAATTTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCAGACATGAAGCCTCAG
 CAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAGGTCCTCTTTTTTAGAAATGTGG
 TATGGCTTATCAAAAAGGACAATGCATACCCAACAATAAAGAGAAGTTACAATAATAC
 CAACCAAGAAGATCTTTTGGTATTGTGGGGGATTACCATCCAAATGATGCCGACAGA
 GCAGACAAGGCTCTATCAAAAACCAACTACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTA
 AACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCCACTAGATCTAAGGTAACCGGCAAGTGGA
 AGGATGGAGTTCTTTTGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATAAACTTTGAGAGTA
 ATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAAAATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAAC
 AATTATGAAAAGTGAGTTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATA
 GGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATCCACCCTCTCACCATCGGGGAA
 TGCCCCAAATATGTGAAATCAAGCAGATTAGTCCTTGCTACTGGGCTCAGAAATAGC
 CCTCAAACCGAGACCCGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGA
 TGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGGGAG
 TGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAA
 GGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCTGTTGGAAGGGAATT
 TAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAAAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGATTCCT
 AGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTA
 GACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGG
 GATAATGCAAAGGAGCTTGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAGATGTGATAATG
 AATGTATGGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAAGAAG
 CAAGATTAAGAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAATTTGGAATCAATAGGAACTTACCA
 AATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCT
 GGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAA
 TTTGTGAGTTCAGATTGTAGTTAAAAACACCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 9)

NA

AGCAAAAGCAGGAGTTCAAAATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACCATCGGATCAAT
CTGTATGGTAATTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAATA
TGGGTCAGTCATTCAATTCAGACAGGGAATCAATGCCAAGCTGAACCAATCAGCAATA
CTAAATTTCTTACTGAGAAAGCTGTGGCTTCAGTAACATTAGCGGGCAATTCATCTCT
TTGCCCCATTAGCGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAACAGTATAAGGATCGGTTC
CAGGGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGGAATG
CAGAACTTTCTTTTGGACTCAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGAC
TGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCC
CTCCCCATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCATGAT
GGCACCAGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTGGTCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGT
ATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACACCATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTG
AGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTG
ATGGACCAAGTAGTGGGCAGGCATCATATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAAAG
TGTTTAAATCAGTCGAATTGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAGTGCTCCTGTTA
TCCTGATGCCGGCGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAAATAG
GCCATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGTGGA
GTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCGGTGTTC
TCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGTTGG
ATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTTGGGACCCA
AATGGGTGGACTGGAACGGACAGTAGCTTTTCGGTGAAGCAAGATATCGTAGCAATA
ACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAAGTACAGAGATTA
GATTGCATAAGACCTTGTTTCTGGGTTGAGTTAATCAGAGGGCGGCCTAAAGAGAGC
ACAATTTGGACCAGTGGGAGCAGCATATCTTTTTGTGGTGTAAATAGTGACACTGTTA
GTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAGTTTGTTC
AAAAAATCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 10)

M

AGCAAAAGCAGGTAGATGTTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCAAACGTACGT
TCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAACTTGAAGA
TGTCTTTGTCAGGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAG
ACCAATCCTGTACCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACAGCTCACCGTG
CCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAA
TGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAGA
AATAACATTCATGGGGCTAAGGAGGTGCGCACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTTGC
CAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACGGTGACTACGGAAGTGGCTTT
TGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTCACAGCATCGGTCTCACAG
ACAGATGGCAACTATCACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGC
CAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCG
GAAGCCATGGAGATCGCTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAAT
TGGGACTCATCCTAATCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTTGCAG
GCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTATTGTTGT
TGCCGCAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTCT
TCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTGCTACGGCAG
GGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTACCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGAT
GTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATTGGAGTAAAAAATACCTTGTTTCTACT
(SEQ ID NO: 3)

Figura 3 (continuación)

NS

AGCAAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGG
TAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGAAC'TGGGTGATG
CCCCATTCCCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAAC
ACTCTTGGTCTGGACATCGAAACAGCTACTCGCGCAGGAAAAGCAGATAGTGGAGCG
GATTCTGGAGGGGGAGTCTGATAAGGCAC'TTAAAATGCCGGCTTCACGCTACCTAAC
TGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAA
AGTGGCAGGTTCCCTTTGCATCAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAACCATCAT
ATTGAAAGCAAAC'TTCAGTGTGATTTTTTGACCGGTTGGAAACCTAATACTACTTAGA
GCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATTACCTTCTCTTCCA
GGACATACTGGTGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGCGTCCTCATCGGAGGACTTGAA
TGGAATGATAACACAGTTCGAGTCACTGAACTATACAGAGATTCGCTTGGAGAAAC
AGTGATGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTCCAAATCAGAAACGGTAAATGGCGAGA
ACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTAAGACATAG
ATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACATA
CTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAA
AAACACCCTTGTTCCTACT (SEQ ID NO: 4)

NP

AGCAAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACCGAGTGACATCAGCATCATGGCGTCTCAA
GGCACCAAACGATCTTATGAACAGATGGAAACTGGTGGGGAACGCCAGAATGCTACT
GAGATCAGGGCATCTGTTGGAAGAAATGGTTAGTGGCATTGGGAGGTTCTACATACAG
ATGTGCACAGAACTCAAAC'TCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATA
ACAATAGAGAGAATGGTACTCTCTGCATTTGATGAAAGAAGGAACAGATACCTGGAA
GAACACCCCACTGCGGGAAAGGACCCGAAGAAGACTGGAGGTCCAATTTATCGGAG
GAGAGACGGGAAATGGGTGAGAGAGCTAAT'TCTGTACGACAAAGAGGAGATCAGGA
GGATTTGGCGTCAAGCGAACAATGGAGAGGACGCAACTGCTGGTCTTACCCACCTG
ATGATATGGCATTTCCAATCTAAATGATGCCACATATCAGAGAACGAGAGCTCTCGTG
CGTACTGGAATGGACCCAAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGGTCAACTCTCCCGAG
GAGATCTGGAGCTGCCGGTGCAGCAGTAAAGGGGGTAGGGACAATGGTGATGGAG
CTGATTCGGATGATAAAACGAGGGATCAACGACCGGAATTTCTGGAGAGGCGAAAAT
GGAAGAAGAACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTC
CAAACAGCAGCACAAAGAGCAATGATGGATCAAGTGCGAGAGAGCAGAAATCCTGG
GAATGCTGAAATTGAAGATCTCATTTTTCTTGGCACGGTCTGCACTCATCCTGAGAGG
ATCAGTGGCCCATAAAGTCCTGCTTGCCTGCTTGTGTGTACGGACTTGCAGTGGCCAG
TGGATATGACTTTGAGAGAGAAGGGTACTCTCTGGTTGGAATAGATCCTTTCCGCCT
GCTTCAAAACAGCCAGGTCTTTAGTCTCATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAG
AGTCAATTAGTGTGGATGGCATGCCACTCTGCAGCATTTGAGGACCTTAGAGTCTCA
AGTTTCATCAGAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAGCTATCCACCAGAGGGGT
TCAAATTGCTTCAAATGAGAACATGGAGGCAATGGACTCCAACACTCTTGAAGTGAAG
AAGCAGATATTGGGCTATAAGAACCAGAAAGCGGAGGAAACACCAACCAGCAGAGGG
CATCTGCAGGACAGATCAGCGTTCAGCCCACTTTCTCGGTCCAGAGAAACCTTCCCT
TCGAAAGAGCGACCATTATGGCAGCATTTACAGGAAATACTGAGGGCAGAACGTCTG
ACATGAGGACTGAAATCATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTAT
TCCAGGGGGCGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGT
GCCTTCCTTTGACATGAATAATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAG
TATGACAATTAAAGAAAAATACCCTTGTTCCTACT (SEQ ID NO: 5)

Figura 3 (continuación)

PA

AGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCA
 ATGATTGTCGAGCTTTCGCGAAAAGGCAATGAAAAGATATGGGGAAGATCCGAAAATC
 GAAACGAACAAGTTTGCTGCAATATGCACACACTTGGAGGTCTGTTTCATGTATTTCGG
 ATTTTTCACTTTATTGATGAACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAA
 TGCAATTATTGAAACACCGATTTGAAATAATTGAAGGAAGAGACCGAACGATGGCCTG
 GACTGTGGTGAATAGTATCTGCAACACCACAGGAGTTGAGAAACCTAAATTTCTCCC
 AGATTTGTATGACTACAAAGAGAACCGATTCATCGAAATTGGAGTGACACGGAGGGA
 AGTTCATACATACTATCTGGAGAAAGCCAACAAGATAAAATCCGAGGAGACACATATT
 CACATATTCTCATTACAGGGGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCTTGAT
 GAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAACCAGGCTGTTTACCATAAGGCAGGAAATGGC
 CAGTAGGGGTCTATGGGATTCTTTCGTCAATCCGAGAGAGGCGAAGAGACAATTGA
 AGAAAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAGACTTGCAGACCAAAGTCTCCCACC
 GAACTTCTCCAGCCTTGAAAATTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGCAACCGAACGG
 CTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAAAGAGTGAATGCTAGAATTGAGCC
 ATTTTGAAGACAACGCCACGCCCTCTCAGACTACCTGATGGGCCTCCTTGCTCTCA
 GCGGTGCAAGTTCTTGCTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCGAAGACCCGAGTCA
 TGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTCGG
 CTGGAAGAGCCCAACATCGTGAAACCACATGAAAAAGGTATAAACCCCAATTACCT
 CCTGGCTTGGAAGCAAGTGCTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAAAT
 CCCAAAAACAAAGAACATGAAAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACCTCGGTGAGAA
 CATGGCACCCAGAGAAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATCTAAGACA
 GTATGACAGTGATGAACCAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATT
 CAACAAGGCATGTGAATTGACAGATTGATTTGGATTGAACTCGATGAAATAGGAGA
 AGACGTAGCTCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTATTTTACAGCGGA
 AGTATCCCATTCAGGGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGACATAAACACAGC
 CCTGTTGAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGC
 AAATGCAGAACCAAGAAGGAAGACGGAACCAATACTGTATGGATTGATTATAAAAG
 GGAGATCCCACTTGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTTGTGAGTATGGAATTCTC
 TCTTACTGATCCGAGGCTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGTCTCTGAGAT
 AGGAGACATGCTCCTCCGACTGCAGTAGGCCAAGTTTCGAGGCCCATGTTCTCTGT
 ATGTAAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAAAATGAAATGGGGCATGGAATGAGGC
 GATGCCTTCTTCAATCCCTTCAACAAATTGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTCTGT
 CAAAGAGAAGGACATGACCAAAGAATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCGATT
 GGAGAGTCCCCAAGGGAGTGGAGGAAGGCTCCATCGGAAAGGTGTGCAGAACCTT
 GCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTTTC
 AGCTGAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACC
 TGGGACCTTCGATCTTGAGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAAACGA
 TCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGTTTCAACTCCTTCCTCGCACATGCACTGAAA
 TAGTTGTGGCAATGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAGTACCTTGTTTCTA
 CT (SEQ ID NO: 6)

Figura 3 (continuación)

PB1

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTGGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTGAAAG
TACCAGTGCAAAATGCTATAAGTACCACCTTCCCTTATACTGGAGACCCCTCCATACAG
CCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTC
AGAAAAGGGGAAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCACTCAACCCGA
TTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAGCCCAGTGGGTACGCACAAACAGATTGTG
TATTGGAAGCAATGGCTTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAACTCGT
GTCTTGAAACGATGGAAATTGTTCAACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCCAAGGTC
GCCAGACCTATGACTGGACATTGAATAGAAACCAACCGGCTGCAACTGCTTTGGCCA
ACACTATAGAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAATGAATCGGGACGGCTAA
TAGATTTCCCTCAAGGATGTGATGGAGTCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAA
CACATTTCCAGAGAAAGAGAAGGGTGAGGGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACAC
AAAGAACAATAGGGAAGAAAAAACAAAGGCTGAACAAAAAGAGCTACCTGATAAGAG
CACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAAGAGGCAAAATGAAGAGGCGAG
CGATTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCGTGTACTTTGTTGAAACACTAG
CGAGGAGTATCTGTGAGAACTTGAGCAATCTGGACTCCCAGTCGGAGGGAATGAG
AAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTCGTGAGGAAGATGATGACTAACTCACAAGATACT
GAACCTCTCCTTTACAATTACTGGAGACAATACCAAATGGAATGAGAATCAGAATCCTA
GGATGTTTTCTGGCAATGATAACGTACATCACAAGGAACAGCCAGAATGGTTTTCGGA
ATGTCTTAAGCATAGCTCCTATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTAGGAAAAGG
ATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAACACAAAATACCAGCAGAAATGCTT
GCAAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAATAAG
GCCTCTATTAATAGATGGTACAGCCTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTT
CAACATGCTGAGTACAGTCTTAGGAGTTTCAATCCTGAATCTTGACAGAAAAGGTA
CACCAAAACCACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGATGATTTGCTCTCAT
CGTAAATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGAC
TTGTAAACTAGTTGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGG
ACATTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCGCTATGGATTTGTAGCCAATTTTCAGTATGG
AGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGCATTGGTG
TTACAGTGATAAAAAACAATATGATAAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGAT
GGCTCTTCAGTTATTCATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGA
TACGCAAATCCAAACAAGGAGATCATTGAGCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAAACCC
GTTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTTAGATGGAGGACCAAATCTATACAATATCCGAA
ACCTCCATATTCCTGAAGTCTGCTTAAAAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGG
CAGACTGTGTAAATCCTCTGAATCCATTGTCAGCCATAAGGAAATGAATCTGTCAAC
AATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGGCCAAGAGTATGGAATATGATGCCGTT
GCAACTACACATTCATGGATTCTTAAAGGAACCGTTCCATTCTCAATACGAGTCAAA
GGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCAATCTATTCGAGAAAT
TCTTCCCCAGCAGTTCATATCGGAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCA
TGGTGTCTAGGGCCCGAATTGACGCACGAATCGATTTTCGAGTCTGGAAGGATTAAGA
AAGAAGAGTTTGCCGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAATCAGACGGC
AAAAATAGTGAATTTAGCTTGCTCCTTCGTGAAAAAATGCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 7)

Figura 3 (continuación)

EP 2 376 628 B1

PB2

AGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATGGAGAGGATAAAAGAATTACGAGATCTAA
 TGTACAGTCCCGCACTCGCGAGATACTAACAAAAACCACTGTGGACCATATGGCCA
 TAATCAAGAAATACACATCAGGAAGACAAGAGAAGAACCTGTCTCAGAATGAAAT
 GGATGATGGCAATGAAATATCCAATCACAGCGGACAAGAGAATAATAGAGATGATTC
 CTGAAAGGAATGAACAAGGGCAGACGCTCTGGAGCAAGACAAATGATGCTGGATCG
 GACAGGGTGATGGTGTCTCCCTTAGCTGTAAGTTGGTGGAAATAGGAATGGGCCGGC
 GACAAGTGCAGTTCAATTATCCAAAGGTTTACAAAACATACTTTGAGAAGGTTGAAAGA
 TTTAAACATGGAACCTTCGGTCCCGTTTCAATTTCCGAAACAGGTTAAAAATACGCCGC
 CGAGTTGATATAAATCCTGGCCATGCAGATCTCAGTGCTAAAGAAGCACAAGATGTC
 ATCATGGAGGTCGTTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCTAGAATATTGACATCAGAGTCG
 CAATTGACAATAACGAAAGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAAGATTGTAAGATTGCTCCC
 TTAATGGTTGCATACATGTTGGAAGGGAAGTGGTCCGCAAGACCAGATTCCCTACCG
 GTAGCAGCGGGAACAAGTAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTGACTCAAGGGACC
 TGCTGGGAACAGATGTACACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAATGACGATGTTGACCA
 GAGTTTGATCATTGCTGCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACAGTATCAGCGGATCC
 ACTGGCATCACTGCTGGAGATGTGTACAGCACACAAATTGGTGGGATAAGGATGGT
 GGACATCCTTAGGCAAAATCCAAGTGAAGAACAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGC
 AATGGGTCTTAGGATCAGTTCTTCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAGAACA
 AGTGATCATCCGTCAAGAAGGAAGAGGAAGTGTCTTACAGGCAACCTCCAAACATTG
 AAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTCAAAATGGTTGGGCGGAGGGCAAC
 AGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAAGCTGATTGATTGATAGTAAGTGGAAGAGA
 CCAACAATCAATCGCTGAGGCAATCATGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTG
 CATGATAAAGGCAGTCCGAGGCGATCTGAATTTCTGTAACAGAGCAAAACCAAGATT
 AAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAGGACGCAAAAGTGCTATTTTCA
 AATTGGGGAATTGAACCATTTGATAATGTGATGGGGATGATCGGAATATTACCTGACA
 TGACTCCAGCACAGAAATGTCAGTGAAGAGTAAGAGTTAGTAAATGGGAGTGG
 ATGAATATTCAGCACTGAGAGAGTAGTTGTAAGTATTGACCGTTTCTTAAGGGTTG
 AGATCAGCGGGGAACGTACTCTTATCTCCCGAAGAGGTGAGCGAAACCCAGGGAA
 CAGAGAAATTGACAATAACATATTCATCATCAATGATGTGGGAAATCAACGGTCTCTGA
 GTCAGTGCTTGTAAACACCTATCAGTGGATCATCAGAACTGGGAGACTGTGAAGAT
 TCAATGTCTCAAGACCCACGATGCTGTACAATAAGATGGAGTTTGAACCGTTCCA
 ATCCTTGGTACCCAAAGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTGTGAGAACATTATTC
 CAGCAATGCGTGACGTACTGGGGACATTTGATACTGTCCAGATAATAAGCTGCTA
 CCATTTGCAGCAGCCCCACCGAAGCAGAGCAGAATGCAGTTTCTTCTCTAACTGTG
 AATGTGAGAGGCTCAGGAATGAGAATACTCGTAAGGGGCAATCCCCGTGTGTCAAC
 TACAATAAGGCAACCAAAAGGCTTACCGTCTTGGAAAGGACGCGAGGTGCATTAAAC
 GAGGATCCGGATGAAGGACAGCCGAGTGGAGTCTGCAGTACTGAGGGGATTTCTT
 AATTTTAGGCAAGGAGGACAAAGGTATGGACCAGCATTGAGCATCAATGAAGTGAAG
 CAATCTTGCGAAGGGGGAGAAAGCTAATGTGCTGATAGGGCAAGGTGACGTGGTGT
 TGGTAATGAAACGAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCA
 AAAGAATTCCGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATTGTTTAAAAACGACCTTGTCTTA
 CT (SEQ ID NO: 8)

Figure 3 (cont'd)

FIGURA 4**Secuencias génicas de la cepa atenuada A/AnHui/1/05****HA**

AGCAAAAGCAGGGGTTCAATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATA
 GTCAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAG
 AGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACT
 GGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTGATTTT
 AAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCAT
 CAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAACCCAGCCAATGACCTCTG
 TTACCCAGGGAATTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAAC
 CATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCAT
 CAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAACGCCCTCCTTTTTCAGAAATGTGG
 TATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCCAACAATAAAGAGAAGCTACAATAATAC
 CAACCAGGAAGATCTTTTGATACTGTGGGGGATTCATCATTCTAATGATGCGGCAGA
 GCAGACAAAGATCTATCAAAACCCAACCACTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTA
 AACCAGAGATTGGTACCAGAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGA
 AGGATGGATTTCTTCTGGACAATTTTAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTA
 ATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGTCAAGAAAGGGGACTCAGC
 AATTGTTAAAAGTGAAGTGGAATATGGTAACTGCAACACAAAGTGTCAAACCTCCAATA
 GGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAA
 TGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAAATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGTC
 CTCAAACCGAGACCCGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGGTTTATAGAGGGAGGAT
 GGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGT
 GGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAG
 GTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTT
 AATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAAATGGAAGACGGATTCTTAG
 ATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGA
 CTTCCATGATTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGAT
 AATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAATGTGATAATGAAT
 GTATGGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTGAGAAGAAGCAA
 GATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAATTTGGAATCAATAGGAACTTACCAAAT
 ACTGTCAATTTATTCAACAGTTGCGAGTTCTCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCTGGT
 CTATCTTTGTGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAATTT
 GTGAGTTCAGATTGTAGTTAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 11)

NA

AGCAAAAGCAGGAGTTCAAAATGAATCCAAATCAGAAGATAATAAACCATTGGGTCAAT
CTGTATGGTAATTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAATAT
GGGTCAGTCATTCAATTCAAACAGGGAATCAACACCAAGCTGAACCAATCAGAAATG
CTAATTTTCTTACTGAGAACGCTGTGGCTTCAGTAACATTAGCGGGCAATTCTCTCT
TTGCCCCGTTAGAGGATGGGCTGTACACAGTAAAGACAACAGTATAAGGATTGGTTC
CAAGGGGGATGTTTTGTTATTAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGGAATG
CAGAACTTTCTTTTGGACTCAGGGAGCCTTACTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACT
GTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCC
TCCCCATATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGCCATGATG
GCACCAAGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGTAT
TGAAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAG
AACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGCTCTTGCTTTACTGTAATGACTGAT
GGACCAAGTAATGGGCAGGCATCATATAAGATCTTCAAAATGGAAAAAGGGAAAGTG
GTTAAATCAGTCGAATTGAATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATC
CTGATGCTGGCGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCGAATAGGC
CATGGGTATCTTTCAATCAGAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGTGGAGT
TTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCAGTGCTCCCC
TAACGGGGCATATGGGATAAAAGGGTTTTCATTTAAATACGGCAATGGTGTTTGGATC
GGAAGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCCAAAT
GGGTGGACTGAAACGGACAGTAACTTTTCGGTGAAACAAGATATAGTAGCAATAACT
GATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGATTAGAT
TGATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAGTTAATCAGAGGGCGGCCCAAAGAGAGCACA
ATTTGGACTAGTTGGGAGCAGCATATCTTTTTGTGGTGTAATAGTGACACTGTGAGTT
GGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAGTTTGTTCAAA
AAACTCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 12)

M

AGCAAAAGCAGGTAGATGTTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTGAAACGTACGT
TCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAACTTGAAGA
TGTCTTTGCAGGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAG
ACCAATCCTGTACCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTG
CCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAA
TGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAGA
AATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTGCACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTTGCT
CAGTTGCATGGGTCTCATATACACAGGATGGGAACGGTGACTACGGAAGTGGCTTT
TGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTACAGCATCGGTCTCACAG
ACAGATGGCAACTATACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTGCTGGC
CAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCG
GAAGCCATGGAGATCGCTAATCAGGCTAGGCAGATGGTGAGGCAATGAGGACAAT
TGGGACTCATCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTGAAAATTTGCAG
GCCTACCAGAAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTATTGTTGT
TGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTCT
TCAAATGCATTTTATCGTCGCCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTGCTACGGCAG
GGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGGTACCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGAT
GTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATTGGAGTAAAAAACTACCTTGTTTCTACT
(SEQ ID NO: 3)

Figura 4 (continuación)

NS

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGG
TAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGAAGTGGGTGATG
CCCCATTCTTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAAC
ACTCTTGGTCTGGACATCGAAACAGCTACTCGCGCAGGAAAGCAGATAGTGGAGCG
GATTCTGGAGGGGGAGTCTGATAAGGCACCTTAAAATGCCGGCTTCACGCTACCTAAC
TGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAA
AGTGGCAGGTTCCTTTGCATCAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAACCATCAT
ATTGAAAGCAAACCTTCAGTGTGATTTTTGACCGGTTGGAAACCCCTAATACTACTTAGA
GCTTTTACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATTACCTTCTCTTCCA
GGACATACTGGTGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGCGTCCTCATCGGAGGACTTGAA
TGGAATGATAACACAGTTCGAGTCACTGAACTATACAGAGATTCTGCTTGGAGAAAC
AGTGATGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTCCAAATCAGAAACGGTAAATGGCGAGA
ACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTAAGACATAG
ATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAATA
CTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAA
AAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 4)

NP

AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACCGAGTGACATCAGCATCATGGCGTCTCAA
GGCACCAAACGATCTTATGAACAGATGGAACTGGTGGGGAACGCCAGAATGCTACT
GAGATCAGGGCATCTGTTGGAAGAATGGTTAGTGGCATTGGGAGGTTCTACATACAG
ATGTGCACAGAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATA
ACAATAGAGAGAATGGTACTCTCTGCATTTGATGAAAGAAGGAACAGATACCTGGAA
GAACACCCCACTGCGGGAAAGGACCCGAAGAAGACTGGAGGTCCAATTTATCGGAG
GAGAGACGGGAAATGGGTGAGAGAGCTAATTCTGTACGACAAAGAGGAGATCAGGA
GGATTTGGCGTCAAGCGAACAATGGAGAGGACGCAACTGCTGGTCTTACCCACCTG
ATGATATGGCAATCCAATCTAAATGATGCCACATATCAGAGAACGAGAGCTCTCGTG
CGTACTGGAATGGACCCAAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGGTCAACTCTCCCGAG
GAGATCTGGAGCTGCCGGTGACGAGTAAAGGGGGTAGGGACAATGGTGATGGAG
CTGATTCCGATGATAAAACGAGGGATCAACGACCGGAATTTCTGGAGAGGCGAAAAT
GGAAGAAGAACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTC
CAAACAGCAGCACAAAGAGCAATGATGGATCAAGTGCGAGAGAGCAGAAATCCTGG
GAATGCTGAAATGAAGATCTCATTTTTCTGGCACGGTCTGCACTCATCCTGAGAGG
ATCAGTGGCCCATAGTCTGCTTGCTGCTTGTGTGTACGGACTTGCAAGTGGCCAG
TGGATATGACTTTGAGAGAGAAGGGTACTCTCTGGTTGGAATAGATCCTTTCCGCCT
GCTTCAAAACAGCCAGGTCTTTAGTCTCATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAG
AGTCAATTAGTGTGGATGGCATGCCACTCTGCAGCATTTGAGGACCTTAGAGTCTCA
AGTTTCATCAGAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAGCTATCCACCAGAGGGGT
TCAAATTGCTTCAAATGAGAACATGGAGGCAATGGACTCCAACACTCTTGAAGTGA
AAGCAGATATTGGGCTATAAGAACCAGAAGCGGAGGAAACACCAACCAGCAGAGGG
CATCTGCAGGACAGATCAGCGTTCAGCCCACTTTCTCGGTCCAGAGAAACCTTCCCT
TCGAAAGAGCGACCATTATGGCAGCATTTACAGGAAATACTGAGGGCAGAACGTCTG
ACATGAGGACTGAAATCATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTAT
TCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGT
GCCTTCCCTTTGACATGAATAATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAG
TATGACAAATTAAAGAAAAATACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO: 5)

Figura 4 (continuación)

PA

AGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCA
 ATGATTGTGAGCTTGGCGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATC
 GAAACGAACAAGTTTGTGCAATATGCACACACTTGGAGGTCTGTTTCATGTATTCTGG
 ATTTTCACTTTATTGATGAACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAA
 TGCATTATTGAAACACCGATTGAAATAATTGAAGGAAGAGACCGAACGATGGCCTG
 GACTGTGGTGAATAGTATCTGCAACACCACAGGAGTTGAGAAACCTAAATTTCTCCC
 AGATTTGTATGACTACAAAGAGAACCGATTTCATCGAAATTGGAGTGACACGGAGGGA
 AGTTCATACATACTATCTGGAGAAAGCCAACAAGATAAAAATCCGAGGAGACACATATT
 CACATATTCTCATTACAGGGGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCCTTGAT
 GAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAACCAGGCTGTTACCATAAGGCAGGAAATGGC
 CAGTAGGGGTCTATGGGATTCTTTTCGTCAATCCGAGAGAGGGCGAAGAGACAATTGA
 AGAAAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAGACTTGCAGACCAAAGTCTCCACC
 GAACCTTCTCCAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGGAACCGAACGG
 CTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAATGCTAGAAATGAGGCC
 ATTTTGAAGACAACGCCACGCCCTCTCAGACTACCTGATGGGCCTCCTTGCTCTCA
 GCGGTGGAAGTTCTTGCTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCGAAGACCCGAGTCA
 TGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTCGG
 CTGGAAGAGCCCAACATCGTGAAACCACATGAAAAGGTATAAACCCCAATTACCT
 CCTGGCTTGGAAGCAAGTGCTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAAT
 CCAAAAAACAAAGACATGAAAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTCGGTGAGAA
 CATGGCACCAGAGAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATCTAAGACA
 GTATGACAGTGATGAACCAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATT
 CAACAAGGCATGTGAATTGACAGATTGATTTGGATTGAACTCGATGAAATAGGAGA
 AGACGTAGCTCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTATTTTACAGCGGA
 AGTATCCCATTCAGGGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGACATAAACACAGC
 CCTGTTGAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGC
 AAATGCAGAACCAAGAAGGAAGACGGAAAACTAATCTGTATGGATTCAATATAAAG
 GGAGATCCCCTTGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTGTGAGTATGGAATTCCTC
 TCTTACTGATCCGAGGCTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGTCTCTGAGAT
 AGGAGACATGCTCCTCCGACTGCAGTAGGCCAAGTTTCGAGGCCCATGTTCTCTGT
 ATGTAAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAATGAAATGGGGCATGGAATGAGGC
 GATGCCTTCTTCAATCCCTTCAACAAATTGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTCTGT
 CAAAGAGAAGGACATGACCAAAGAATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCGATT
 GGAGAGTCCCCAAGGGAGTGGAGGAAGGCTCCATCGGAAAGGTGTGCAGAACCTT
 GCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTTTT
 AGCTGAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACC
 TGGGACCTTCGATCTTGAGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAAACGA
 TCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGTTCAACTCCTTCCTCGCACATGCACTGAAA
 TAGTTGTGGCAATGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTCTTA
 CT (SEQ ID NO: 6)

Figura 4 (continuación)

PB1

AGCGAAAAGCAGGCAAAACCATTGGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTTCTTGAAAG
TACCACTGCAAAAATGCTATAAGTACCACCTTCCCTTATACTGGAGACCCTCCATACAG
CCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTC
AGAAAAGGGGAAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCACTCAACCCGA
TTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAGCCCAGTGGGTACGCACAAACAGATTGTG
TATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGT
GTCTTGAAACGATGGAAAATTGTTCAACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCCAAGGTC
GCCAGACCTATGACTGGACATTGAATAGAAACCAACCGGCTGCAACTGCTTTGGCCA
ACACTATAGAAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAATGAATCGGGACGGCTAA
TAGATTTCTCTCAAGGATGTGATGGAGTCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAA
CACATTTCCAGAGAAAAGAGAAGGGTGAGGGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACAC
AAAGAACAATAGGGGAAGAAAAACAAAGGCTGAACAAAAAGAGCTACCTGATAAGAG
CACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAGAGGCAAATTGAAGAGGCGAG
CGATTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCTGTGACTTTGTTGAAACACTAG
CGAGGAGTATCTGTGAGAACTTGAGCAATCTGGACTCCAGTCGGAGGGGAATGGAG
AAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTCGTGAGGAAGATGATGACTAACTCACAAGATACT
GAACTCTCCTTTACAATTACTGGAGACAATACCAAATGGAATGAGAATCAGAATCCTA
GGATGTTTCTGGCAATGATAACGTACATCACAAGGAACCCAGCCAGAATGGTTCGGA
ATGTCTTAAGCATAGCTCCTATAATGTTCTCAAACAAAAATGGCGAGACTAGGAAAAGG
ATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAACACAAAATACCAGCAGAAATGCTT
GCAAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAATAAG
GCCTCTATTAATAGATGGTACAGCCTCATTTAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTT
CAACATGCTGAGTACAGTCCTAGGAGTTTCAATCCTGAATCTTGGACAGAAAAGGTA
CACCAAAACCACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGATGATTTTCGCTCTCAT
CGTAAATGCACCGAATCATGAGGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGAC
TTGTAAACTAGTTGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGG
ACATTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCGCTATGGATTTGTAGCCAATTTTCAGTATGG
AGCTGCCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGCATTGGTG
TTACAGTGATAAAAAACAATATGATAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGAT
GGCTCTTCAGTTATTTCATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGA
TACGCAAATCCAAACAAGGAGATCATTCGAGCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAAACCC
GTTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTCAGATGGAGGACCAAATCTATACAAATATCCGAA
ACCTCCATATTCTGAACTCTGCTTAAAAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGG
CAGACTGTGTAATCCTCTGAATCCATTCTGTCAGCCATAAGGAAAATGAATCTGTCAAC
AATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGCCAAGAGTATGGAATATGATGCCGTT
GCAACTACACATTTCATGGATTCTTAAAAGGAACCGTTCATTCTCAATACGAGTCAAA
GGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCAATCTATTCGAGAAAT
TCTTCCCCAGCAGTTTCATATCGGAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCA
TGGTGTCTAGGGCCCGAATTGACGCACGAATCGATTTTCGAGTCTGGAAGGATTAAGA
AAGAAGAGTTTGCCGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGC
AAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCGTGAAAAAATGCCTTGTCTTACT (SEQ ID NO: 7)

Figura 4 (continuación)

PB2

AGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATGGAGAGGATAAAAAGAATTACGAGATCTAA
 TGTACAGTCCCGCACTCGCGAGATACTAACAAAAACCCTGTGGACCATATGGCCA
 TAATCAAGAAATACACATCAGGAAGACAAGAGAAGAACCCTGCTCTCAGAATGAAAT
 GGATGATGGCAATGAAATATCCAATCACAGCGGACAAGAGAATAATAGAGATGATTC
 CTGAAAAGGAATGAACAAGGGCAGACGCTCTGGAGCAAGACAAATGATGCTGGATCG
 GACAGGGTGATGGTGTCTCCCCTAGCTGTAACTTGGTGGAATAGGAATGGGCCGGC
 GACAAGTGCAGTTCATTATCCAAAGGTTTACAAAACATACTTTGAGAAGGTTGAAAGA
 TTAAAAACATGGAACCTTCGGTCCCGTTCATTTCCGAAACCAGGTTAAAATACGCCGC
 CGAGTTGATATAAATCCTGGCCATGCAGATCTCAGTGCTAAAGAAGCACAAGATGTC
 ATCATGGAGGTCGTTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCTAGAATATTGACATCAGAGTCG
 CAATTGACAATAACGAAAGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAAGATTGTAAGATTGCTCCC
 TTAATGGTTGCATACATGTTGGAAAGGGAAGTGGTCCGCAAGACCAGATTCTACCG
 GTAGCAGGCGGAACAAGTAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTGACTCAAGGGACC
 TGCTGGGAACAGATGTACACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAATGACGATGTTGACCA
 GAGTTTGATCATTGCTGCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACAGTATCAGCGGATCC
 ACTGGCATCACTGCTGGAGATGTGTACAGCACACAAATTGGTGGGATAAGGATGGT
 GGACATCCTTAGGCAAAATCCAAGTGGGAACAAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGC
 AATGGGTCTTAGGATCAGTTCTTCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAAAGAACA
 AGTGGATCATCCGTCAAGAAGGAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTG
 AAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTCACAAATGGTTGGGCGGAGGGCAAC
 AGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTCAGTTGATAGTAAGTGAAGAGA
 CCAACAATCAATCGCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTG
 CATGATAAAGGCAGTCCGAGGCGATCTGAATTTCTGTAACAGAGCAAACCAAAGATT
 AAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAAGGACGCAAAAGTGCTATTTAG
 AATTGGGGGAATTGAACCCATTGATAATGTCTGAGGAGTAAGAGTTAGTAAATGGGAGTGG
 TGACTCCCAGCACAGAAATGTCACTGAGAGGAGTAAGAGTTAGTAAATGGGAGTGG
 ATGAATATTCCAGCACTGAGAGAGTAGTTGTAAGTATTGACCGTTTCTTAAGGGTTTCG
 AGATCAGCGGGGGAACGTACTCTTATCTCCCGAAGAGGTCAGCGAAACCCAGGGAA
 CAGAGAAATTGACAATAACATATTCATCATCAATGATGTGGGAAATCAACGGTCCTGA
 GTCAGTGCTTGTTAACACCTATCAGTGATCATCAGAACTGGGAGACTGTGAAGAT
 TCAATGGTCTCAAGACCCACGATGCTGTACAATAAGATGGAGTTTGAACCGTTCCA
 ATCCTTGGTACCCAAAGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTTGTGAGAACATTATTC
 CAGCAAATGCGTGACGTACTGGGGACATTTGATACTGTCCAGATAATAAAGCTGCTA
 CCATTTGCAGCAGCCCCACCGAAGCAGAGCAGAATGCAGTTTTCTTCTTAAGTGTG
 AATGTGAGAGGCTCAGGAATGAGAATACTCGTAAGGGGCAATCCCCTGTGTTCAAC
 TACAATAAGGCAACCAAAGGCTTACCGTCTTGGAAAGGACGCAGGTGCATTAACA
 GAGGATCCGGATGAAGGGACAGCCGGAGTGGAGTCTGCAGTACTGAGGGGATTCTT
 AATTTTAGGCAAGGAGGACAAAAGGTATGGACCAGCATTGAGCATCAATGAAGTGA
 CAATCTTGCGAAGGGGGAGAAAGCTAATGTGCTGATAGGGCAAGGTGACGTGGTGT
 TGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCA
 AAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATTGTTTAAAAACGACCTTGTCTTA
 CT (SEQ ID NO: 8)

Figura 4 (continuación)