

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 347**

51 Int. Cl.:

C07K 14/11 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010** **PCT/US2010/054128**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011** **WO11056591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010** **E 10777154 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020** **EP 2493912**

54 Título: **Virus recombinantes de la influenza de alto título con replicación mejorada en células Vero**

30 Prioridad:

26.10.2009 US 254795 P

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

23.03.2021

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
Post Office Box 7365
Madison, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**KAWAOKA, YOSHIHIRO;
HORIMOTO, TAISUKE y
MURAKAMI, SHIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 813 347 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus recombinantes de la influenza de alto título con replicación mejorada en células Vero

5 Declaración de derechos gubernamentales

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos otorgado por los National Institutes of Health (subvención NIH AI069274). El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

10 Antecedentes

La influenza es una enfermedad respiratoria importante en algunos mamíferos, incluidos los caballos, y es responsable de una morbilidad y pérdidas económicas sustanciales cada año. Además, las infecciones por el virus de la influenza pueden causar una enfermedad sistémica grave en algunas especies de aves y provocar la muerte. La naturaleza segmentada del genoma del virus de la influenza permite el reordenamiento de segmentos durante la replicación del virus en células infectadas con dos o más virus de la influenza. El reordenamiento de segmentos, combinado con la mutación genética y la deriva, puede dar lugar a una gran variedad de cepas divergentes del virus de la influenza a lo largo del tiempo. Por ejemplo, Dunham et al., (J. Virology, vol. 83 (11) páginas 5485-5494, 2009) describen dos linajes distintos de virus A/H1N1 adaptados a los cerdos. Las nuevas cepas exhiben variación antigénica en sus proteínas hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) y, en particular, el gen que codifica la proteína HA tiene una alta tasa de variabilidad. La práctica actual predominante para la prevención de la gripe es la vacunación. Con mayor frecuencia, se utilizan vacunas de virus completo. Dado que la proteína HA de la influenza es el principal antígeno objetivo para las respuestas inmunitarias protectoras de un huésped al virus y es muy variable, el aislamiento del virus de la influenza y la identificación y caracterización del antígeno HA en virus asociados con brotes recientes es importante para la producción de la vacuna. Según la prevalencia y la predicción, se diseña una vacuna para estimular una respuesta inmunitaria protectora contra las cepas de virus de influenza predominantes y esperadas (Park et al., 2004).

Lin et al., (Virology, vol. 233, páginas 402-410, 1997) describen una serie de virus transfectantes de la influenza, generados por genética inversa, que tienen proteínas HA mutantes que dan como resultado un pH elevado de fusión a la membrana. Hoffman et al., (J. Virol. Vol. 71 (11), páginas 8808-8820, 1997) describen la identificación de moléculas que inhiben el cambio conformacional inductor de fusión en la proteína HA del virus de la influenza.

Govorkova et al., (J. Infect. Dis. Vol. 172 (1), páginas 250-253, 1995) describen la investigación de una línea celular Vero como un sistema huésped adecuado para el aislamiento primario y el cultivo de los virus de la influenza A. Fodor et al., (J. Virol. Vol. 73 (11), páginas 9679-9682, 1999) describen el rescate del virus de la influenza A por transfección de 12 plásmidos en células Vero. El documento WO 2004/112831 describe la preparación de virus de influenza de títulos altos en ausencia de virus auxiliares. Ozaki et al., (J. Virol. Vol. 78 (4), páginas 1851-1857, 2004) describen una cepa maestra de influenza PR8 que comprende un gen NS adaptado a Vero, que ha mejorado el rescate y el crecimiento viral en células Vero. Horimoto et al., (Current Topic Microbiol. Immunol. Vol. 333, páginas 165-176, 2009) describen estrategias para el desarrollo de vacunas contra el H5N1.

Hay tres tipos generales de virus de la influenza, Tipo A, Tipo B y Tipo C, que se definen por la ausencia de reactividad cruzada serológica entre sus proteínas internas. Los virus de la influenza tipo A se clasifican además en subtipos según las diferencias antigénicas y genéticas de sus glicoproteínas, las proteínas HA y NA. Todos los subtipos conocidos de HA y NA (H1 a H15 y N1 a N9) se han aislado de aves acuáticas, que se cree que actúan como reservorios naturales de influenza. Recientemente se ha declarado que el virus de la "gripe porcina" H1N1 es una pandemia. Si bien este virus puede ser menos virulento que algunos virus de la influenza que circulan en ciertas poblaciones, es ubicuo y se ha convertido en el tema de importantes esfuerzos de salud pública. Desafortunadamente, este virus parece ser menos susceptible que otros virus a producciones de títulos altos, lo que puede conducir a desafíos en la fabricación de vacunas.

Sumario de la invención

La invención proporciona una célula Vero infectada con un virus recombinante de la influenza aislado, reordenado que comprende un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.

En una realización adicional, la invención proporciona un virus de influenza aislado que comprende un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a posición 116 en HA2 H3, y que comprende un segmento del gen NA que codifica una proteína NA que tiene una tirosina en la posición correspondiente a la posición 255 en N1 NA.

Una vacuna que tiene el virus aislado definido anteriormente representa una realización adicional de la invención.

En otra realización más, la invención proporciona un método para preparar el virus de la influenza, que comprende poner en contacto una célula cultivada con:

5 uno o más vectores para la producción de ARNV del ARNV de PB1, ARNV de PB2, ARNV de PA, ARNV de HA, ARNV de NP, ARNV de NA, ARNV de M y ARNV de NS, comprendiendo dicho uno o más vectores un promotor operativamente unido, respectivamente, al ADN de PA, PB1, PB2, HA, NP, NA, M o NS del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de transcripción, en la que los ADN de PB1, PB2, PA, NP, NS y M en los vectores para la producción del ARNV son de uno o más aislados del virus para vacuna contra la influenza, en los que el ARNV de NA tiene secuencias para una NA heteróloga, y en la que el ARNV de HA codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3; y

10 uno o más vectores para la producción de ARNm de PA, PB1, PB2 y NP del virus de la influenza, comprendiendo dicho uno o más vectores un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica PA, PB1, PB2 o NP del virus de la influenza, y opcionalmente uno o más vectores para la producción de ARNm de HA, NA, M1, M2 o NS2 del virus de la influenza, comprendiendo dicho uno o más vectores un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica HA, NA, M1, M2 o NS2 del virus de la influenza;

en una cantidad eficaz para producir el virus infeccioso de la influenza.

20 En una realización alternativa, la invención proporciona un método para preparar un virus de influenza recombinante con un segmento del gen HA que tiene un HA2 mutante, que comprende: alterar el ácido nucleico de HA del virus de la influenza para cambiar la asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, por ácido aspártico o ácido glutámico; y expresar el ácido nucleico alterado en una célula que tiene vectores para la producción de ARNV de influenza y producción de proteína viral en una cantidad eficaz para producir virus de influenza recombinante con un segmento del gen HA que tiene el ácido aspártico o ácido glutámico en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.

30 En el presente documento se describen virus de influenza recombinantes aislados, por ejemplo, reordenados, con residuos de aminoácidos seleccionados en posiciones especificadas en HA2, NA y/o PB2. El virus de la influenza recombinante reordenado descrito en este documento tiene un residuo de aminoácido en la posición 117 en HA2 (la posición se basa en la numeración de HA2 H1; por ejemplo, la posición 117 en HA2 H1 corresponde a la posición 116 en HA2 H3) que da como resultado un mayor crecimiento en las células Vero con respecto a un virus correspondiente con, por ejemplo, una asparagina en la posición 117 en HA2, en la que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1. El virus de la influenza recombinante descrito en este documento tiene un residuo de aminoácido en la posición 117 en HA2 que da como resultado la fusión del virus con las membranas en los endosomas, por ejemplo, endosomas tardíos, a un pH más alto con respecto al virus correspondiente con, por ejemplo, una asparagina en posición 117 en HA2, en la que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1. Un virus de influenza recombinante aislado reordenado puede tener seis segmentos de genes "internos" de un virus de influenza para vacuna, un segmento de gen NA seleccionado de un primer aislado de virus de influenza y un segmento del gen HA seleccionado para codificar un ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 117 en HA2, en el que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1. Por ejemplo, los segmentos del gen NA y HA pueden ser de una cepa para una vacuna contra la gripe estacional o de una cepa pandémica y la secuencia de HA2 en el segmento del gen HA está mutada para codificar un ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 117 en HA2, en la que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1.

50 Como se describe en los ejemplos en este documento, un aislado de virus de la influenza útil como virus para vacuna (A/Puerto Rico/8/34 (PR8) para transportar segmentos de genes heterólogos para NA y/o HA se pasó serialmente en células Vero para obtener virus con replicación mejorada en esas células. Se encontró que los virus obtenidos después de pases en serie que tienen una replicación mejorada pueden tener títulos que son al menos 2, 3, 4 o 5 logaritmos más altos que los virus que no fueron pasados en serie. Los virus obtenidos después de pases en serie tenían sustituciones en tres segmentos de genes, NA, HA y PB2, en relación con el virus original. Se determinó que la sustitución en HA2 estaba asociada principalmente con el fenotipo de crecimiento mejorado. El virus PR8 con N117D de HA2 tenía al menos un aumento de tres log en el título en células Vero. El mutante N117D de HA2 fusionó células a un pH más alto que el HA de tipo silvestre. Se prepararon tres virus de influenza recombinantes diferentes (reordenado mutante 6:2) que tenían los mismos genes "internos" de PR8 (es decir, aquellos que no sean los genes de HA y NA), y la NA y HA de un solo aislado, y los que el residuo en la posición 117 (o la posición 116 en el reordenamiento de H3) en HA2 se alteró a ácido aspártico. Todos los reordenamientos mutantes 6:2 mostraron un crecimiento mejorado en las células Vero en relación con el reordenado parental correspondiente 6:2. Por lo tanto, para los virus para vacuna que se van a hacer crecer o pasar en células en cultivo en células Vero, el reemplazo del residuo en la posición 117 en HA2, en la que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1, por ejemplo, por mutación, o selección de un segmento del gen HA con un residuo que confiere un mayor crecimiento del virus en células cultivadas, puede dar como resultado títulos virales significativamente más altos. Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para seleccionar virus de la influenza con replicación mejorada en cultivo celular.

65 El método incluye proporcionar células adecuadas para la producción de vacunas contra la influenza; cultivar en serie uno o más aislados del virus de la influenza en las células; y aislar virus cultivados en serie con crecimiento mejorado

en relación con uno o más aislamientos antes del cultivo en serie. Las células pueden ser de roedores o primates, por ejemplo, células humanas. También se describe en el presente documento un método para identificar una HA2 que confiere un crecimiento alterado de un virus de influenza recombinante. El método incluye introducir una o más sustituciones en el HA2 del virus de la influenza en un segmento del gen HA para producir un segmento del gen HA mutante; e identificar si el segmento del gen HA mutante, cuando está presente en un virus de la influenza recombinante competente en replicación, da como resultado una replicación mejorada del virus de la influenza recombinante en una célula en relación con un virus de la influenza competente en replicación correspondiente sin una o más sustituciones en HA2. Al menos una sustitución puede estar en la posición 117 en HA2, en la que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1, por ejemplo, al menos una sustitución puede ser por ácido aspártico o ácido glutámico. Las células pueden ser células de roedor o de primate. Una o más sustituciones pueden ser un residuo de aminoácido con una cadena lateral ácida.

En una realización, el virus de la influenza aislado de la invención es un virus de tipo A. En una realización, el virus de la influenza tipo A aislado de la invención que comprende un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, tiene una secuencia de aminoácidos de HA2 con al menos 80%, por ejemplo, 90%, 92%, 95%, 97% o 99%, incluyendo cualquier número entero entre 80 y 99, de identidad de secuencia de aminoácidos contiguos con un polipéptido codificado por una de las SEQ ID NO: 16-20 o 22. En una realización, el virus de influenza tipo A aislado de la invención que comprende un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, tiene un HA1 de cualquiera de los subtipos 1-15 de HA.

Se puede introducir una mutación en un segmento del gen HA de un aislado del virus de la influenza, por ejemplo, mediante técnicas de ADN recombinante que incluyen mutagénesis específica de sitio o reemplazando una porción de la secuencia codificante de HA que incluye el residuo 117 de HA2 con una porción que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.

Un segmento de gen HA con un residuo que confiere replicación mejorada en células Vero puede combinarse con un segmento de NA compatible y segmentos del gen interno de un virus para vacuna contra la influenza. La sustitución o sustituciones en la proteína HA2 que dan como resultado la replicación mejorada pueden estar en o dentro de aproximadamente 1 a 10 residuos, o cualquier número entero entre, por ejemplo, en o dentro de 1 a 5 residuos, del residuo 117 de la proteína HA2 del virus de la influenza A, en el que la numeración de los residuos de HA2 es la de HA2 H1. Una proteína NA puede tener al menos una sustitución, por ejemplo, el residuo característico discutido en este documento, tal como uno que da como resultado una replicación mejorada, en o dentro de aproximadamente 1 a 10 residuos, o cualquier número entero entre, por ejemplo, en o dentro de 1 a 5 residuos del codón para el residuo 255 de la proteína NA de virus de la influenza A, en el que la numeración de los residuos de NA es la de N1.

En el presente documento se describe una pluralidad de vectores del virus de la influenza, por ejemplo, los útiles para preparar virus reordenados que incluyen reordenamientos 6:1:1, reordenamientos 6:2 y reordenamientos 7:1. Un reordenamiento 6:1:1 dentro del alcance de la presente invención es un virus de la influenza con 6 segmentos de genes internos de un virus para vacuna, un segmento del gen NA de un (segundo) aislado viral diferente y un segmento de gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, en la que el segmento del gen HA es de una fuente viral diferente al virus para vacuna o al primer aislado viral; un reordenamiento 6:2 dentro del alcance de la presente invención es un virus de la influenza con 6 segmentos de genes internos de un virus para vacuna, y un segmento de gen NA y un segmento de gen HA de un aislado viral diferente (segundo), en el que el segmento del gen HA codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3; y un reordenamiento 7:1 dentro del alcance de la presente invención es un virus de la influenza con 6 segmentos de genes internos y un segmento de gen NA de un virus para vacuna, y un segmento de gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, en la que el segmento del gen HA es de una fuente viral diferente a la del virus para vacuna, o un virus de la influenza con 6 segmentos internos del gen y un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, y un segmento del gen NA es de una fuente viral diferente que el virus para vacuna.

La pluralidad incluye vectores para la producción de ARNv seleccionados de: (i) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de PA del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; (ii) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de PB1 del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; (iii) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de PB2 del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; (iv) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de HA del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; (v) un vector que comprende un promotor operativamente

unido a un ADN de NP del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; (vi) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de NA del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; (vii) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de M del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción; y (viii) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADN de NS del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción. Los ADN para la producción de ARNv de PB1, PB2, PA, NP, M y NS pueden tener secuencias de un virus de la influenza que se replica a títulos altos en células de mamíferos cultivadas tales como células Vero o células PER.C6® y también opcionalmente huevos embrionados y/o de un virus para vacuna, por ejemplo, uno que no causa una enfermedad significativa en humanos. El ADN para la producción de ARNv de NA puede ser de cualquier NA, por ejemplo, cualquiera de N1-N9, y el ADN para la producción de ARNv de HA puede ser de cualquier HA, por ejemplo, H1-H16. Los ADN para la producción de ARNv pueden ser de un virus de influenza B o C. Por ejemplo, los ADN para la producción de ARNv incluyen PA, PB1, PB2, NP, NS y M del virus de la influenza B o PA, PB1, PB2, NP, NS, M y NA del virus de la influenza B, en los que el ARNv para HA codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3. Los ADN para la producción de ARNv de NA y HA pueden ser de diferentes cepas o aislados (reordenamientos 6:1:1) o de la misma cepa o aislado (reordenamientos 6:2), o el NA puede ser de la misma cepa o aislado que el de los genes internos (reordenado 7:1), en los que la secuencia de HA2 codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3. La pluralidad también incluye vectores para la producción de ARNm seleccionados de un vector que codifica PA del virus de la influenza, un vector que codifica PB1 del virus de la influenza, un vector que codifica PB2 del virus de la influenza y un vector que codifica NP del virus de la influenza, y opcionalmente uno o más vectores que codifican NP, NS, M, por ejemplo, M1 y M2, HA o NA. Los vectores que codifican proteínas virales pueden incluir además una secuencia de terminación de la transcripción.

Los virus que pueden proporcionar los genes internos para los reordenamientos dentro del alcance de la invención incluyen virus que tienen títulos altos en las células Vero, por ejemplo, títulos de al menos aproximadamente 10^5 PFU/mL, por ejemplo, al menos 10^6 PFU/mL, 10^7 PFU/mL o 10^8 PFU/mL; títulos altos en huevos embrionados, por ejemplo, títulos de al menos aproximadamente 10^7 EID₅₀/mL, por ejemplo, al menos 10^8 EID₅₀/mL, 10^9 EID₅₀/mL o 10^{10} EID₅₀/mL; títulos altos en células MDCK, por ejemplo, títulos de al menos aproximadamente 10^7 PFU/mL, por ejemplo, al menos 10^8 PFU/mL, o títulos altos en dos o más de esas células huésped.

Los títulos de los virus reordenados de la invención en células Vero pueden ser superiores a 1 log, 2 log, 3 log o más que los títulos del virus correspondiente sin una sustitución de HA2 en un segmento génico para codificar un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.

Se pueden emplear otros reordenamientos con genes internos de otros aislados de PR8 o virus para vacuna en virus recombinantes reordenados de la invención. En particular, reordenamientos 5:1:2 que tienen PB1, PB2, PA, NP y M ("5") de PR8(UW) y NS ("1") de PR8(Cam); reordenamientos 6:1:1 que tienen NA, PB1, PB2, PA, NP y M ("6") de PR8(UW) y NS ("1") de PR8(Cam); y se pueden emplear reordenamientos 7:1 que tienen PB1, PB2, PA, NP, M, NA y NS ("7") de PR8(UW).

En una realización, los ADN para los genes internos de PB1, PB2, PA, NP, M y NS codifican proteínas con sustancialmente la misma actividad que un polipéptido correspondiente codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15. Como se usa en este documento, "sustancialmente la misma actividad" incluye una actividad que es aproximadamente 0,1%, 1%, 10%, 30%, 50%, 90%, por ejemplo, hasta 100% o más, o un nivel de proteína detectable que es aproximadamente 80%, 90% o más, la actividad o el nivel de proteína, respectivamente, del correspondiente polipéptido de longitud completa. En una realización, el ácido nucleico comprende una secuencia que codifica un polipéptido que es sustancialmente la misma que, por ejemplo, que tiene al menos 80%, por ejemplo, 90%, 92%, 95%, 97% o 99%, que incluye cualquier número entero entre 80 y 99, identidad de secuencia de aminoácidos contiguos a, un polipéptido codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15. La molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada puede comprender una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente la misma que, por ejemplo, que tiene al menos 50%, por ejemplo, 60%, 70%, 80% o 90%, que incluye cualquier número entero entre 50 y 100, o más identidad de secuencia de ácidos nucleicos contiguos a una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 33-38 y, en una realización, también codifica un polipéptido que tiene al menos 80%, por ejemplo, 90%, 92%, 95%, 97% o 99%, que incluye cualquier número entero entre 80 y 99, de identidad de secuencia de aminoácidos contiguos a un polipéptido codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15. El polipéptido del virus de la influenza puede tener una o más, por ejemplo, 2, 5, 10, 15, 20 o más, sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo, sustituciones conservadoras de hasta el 10% o el 20% de los residuos, en relación con un polipéptido codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene una cadena lateral que contiene azufre es cisteína y metionina. En una realización, los grupos de sustitución de

aminoácidos conservadores son: valina-leucina-isoleucina; fenilalanina-tirosina; lisina-arginina; alanina-valina; glutámico-aspartico; y asparagina-glutamina. En una realización, el polipéptido del virus de la influenza tiene una o más, por ejemplo, 2, 3 o 4, sustituciones de aminoácidos no conservadoras, con respecto a un polipéptido codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15.

Pueden usarse vectores o plásmidos aislados y purificados, que expresan o codifican proteínas del virus de la influenza, o expresan o codifican ARNv de la influenza, tanto ARNv nativo como recombinante. Los vectores comprenden ADNc de influenza, por ejemplo, influenza A (por ejemplo, cualquier gen de influenza A que incluya cualquiera de los 16 subtipos de HA o 9 de NA), ADN de B o C (véase Fields Virology (Fields et al., (Eds.), Lippincott, Williams y Wickens (2006)). Se puede emplear cualquier promotor o secuencia de terminación de la transcripción adecuada para expresar una proteína o péptido, por ejemplo, una proteína o péptido viral, una proteína o péptido de un patógeno no viral, o una proteína o péptido terapéutico.

Una composición o pluralidad de vectores descritos en el presente documento también puede comprender un gen heterólogo o un marco de lectura abierto de interés, por ejemplo, un gen foráneo que codifica un péptido o proteína inmunogénica útil como vacuna o en el reemplazo de genes. Por ejemplo, puede codificar un epítipo útil en una terapia o vacuna contra el cáncer, o un péptido o polipéptido útil en terapia génica. Cuando se prepara un virus, el vector o plásmido que comprende el gen o el ADNc de interés puede sustituir un vector o plásmido por un gen viral de la influenza o puede ser adicional a los vectores o plásmidos para todos los genes del virus de la influenza. Por lo tanto, en el presente documento se describe una composición o pluralidad de vectores en los que uno de los vectores descritos anteriormente se reemplaza con, o comprende además, secuencias 5' del virus de la influenza que incluyen opcionalmente secuencias 5' codificantes del virus de la influenza o una porción de las mismas, unidas a una secuencia deseada de ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc deseado, unido a secuencias 3' del virus de la influenza que incluyen opcionalmente secuencias 3' codificantes del virus de la influenza o una porción de las mismas. La secuencia de ácido nucleico deseada puede ser un ADNc en una orientación antisentido (antigenómica). La introducción de tal vector junto con los otros vectores descritos anteriormente en una célula huésped permisiva para la replicación del virus de la influenza da como resultado un virus recombinante que comprende ARNv correspondiente a las secuencias heterólogas del vector.

El promotor en un vector para la producción de ARNv puede ser un promotor de ARN polimerasa I, un promotor de ARN polimerasa II, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor de T7 o un promotor de T3, y opcionalmente el vector comprende una secuencia de terminación de la transcripción tal como una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III o una ribozima. Las ribozimas incluyen ribozimas de Tetrahymena, RNasa P, ribozimas de cabeza de martillo, ribozimas en horquilla, ribozima de hepatitis, así como ribozimas sintéticas. En una realización, el promotor de ARN polimerasa I es un promotor de ARN polimerasa I humano.

El promotor o la secuencia de terminación de la transcripción en un ARNv o vector de expresión de proteína viral puede ser igual o diferente con respecto al promotor o cualquier otro vector. En una realización, el vector o plásmido que expresa el ARNv de influenza comprende un promotor adecuado para la expresión en al menos una célula huésped particular, por ejemplo, células huésped de aves o mamíferos tales como células caninas, felinas, equinas, bovinas, ovinas o de primates, incluidas las células humanas, o para expresión en más de un huésped.

En una realización, al menos un vector para ARNv comprende un promotor de ARN polimerasa II unido a una secuencia de ribozima unida a secuencias codificantes virales unidas a otra secuencia de ribozima, opcionalmente unida a una secuencia de terminación de la transcripción de ARN polimerasa II. En una realización, al menos 2, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, vectores para la producción de ARNv comprenden un promotor de ARN polimerasa II, una primera secuencia de ribozima, que es 5' a una secuencia correspondiente a secuencias virales que incluyen secuencias de codificación virales, que es 5' a una segunda secuencia de ribozima, que es 5' a una secuencia de terminación de la transcripción. Cada promotor de ARN polimerasa II en cada vector de ARNv puede ser igual o diferente que el promotor de ARN polimerasa II en cualquier otro vector de ARNv. De manera similar, cada secuencia de ribozima en cada vector de ARNv puede ser igual o diferente que las secuencias de ribozima en cualquier otro vector de ARNv. En una realización, las secuencias de ribozimas en un solo vector no son las mismas.

La pluralidad de vectores del virus de la influenza para un reordenamiento descrito anteriormente puede tener ADN para PB1, PB2, PA, NP, NS y M de uno o más virus semilla para la vacuna contra la influenza, en los que el ADN para NA tiene secuencias para una NA heteróloga, y en los que el ADN para HA codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3. La pluralidad de vectores para la producción de ARNm incluye: (i) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica PA del virus de la influenza; (ii) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica PB1 del virus de la influenza; (iii) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica PB2 del virus de la influenza; y (iv) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica NP del virus de la influenza; y opcionalmente (v) un vector para la producción de

ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica HA del virus de la influenza; (vi) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica NA del virus de la influenza; (vii) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica M1 del virus de la influenza; (viii) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica M2 del virus de la influenza; o (ix) un vector para la producción de ARNm que comprende un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica NS2 del virus de la influenza. En una realización, al menos un vector comprende secuencias correspondientes a aquellas que codifican PB1, PB2, PA, NP, M o NS, o una porción de las mismas, que tienen sustancialmente la misma actividad que un polipéptido correspondiente codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15, por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido con al menos 80%, por ejemplo, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% o 100%, que incluye cualquier número entero entre 80 y 100, identidad de aminoácidos con un polipéptido codificado por una de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15. Opcionalmente, se pueden emplear dos vectores en lugar del vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADNc de M del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción, por ejemplo, un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADNc de M1 del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción y un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ADNc de M2 del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de la transcripción.

Los vectores pueden estar unidos físicamente o cada vector puede estar presente en un plásmido individual u otro vehículo de suministro de ácido nucleico, por ejemplo, lineal. En una realización, cada vector de producción de ARNV está en un plásmido separado. En una realización, cada vector de producción de ARNm está en un plásmido separado.

La invención también proporciona un método para preparar virus de la influenza, que comprende poner en contacto una célula cultivada con una pluralidad de los vectores descritos anteriormente, por ejemplo, secuencial o simultáneamente, en una cantidad eficaz para producir virus de la infección de la influenza. El método puede incluir además una etapa de aislamiento del virus de la célula cultivada en contacto con la pluralidad de vectores. En una realización, el promotor para los vectores de ARNV empleados en el método es un promotor de ARN polimerasa I, un promotor de ARN polimerasa II, un promotor de ARN polimerasa III, un promotor de T3 o un promotor de T7. En una realización, el promotor de ARN polimerasa I es un promotor de ARN polimerasa I humano. En una realización, cada vector de ARNV empleado en el método está en un plásmido separado. En una realización, los vectores de ARNV empleados en el método están en un plásmido o en dos o tres plásmidos diferentes. En una realización, cada vector de ARNm empleado en el método está en un plásmido separado. En una realización, los vectores de ARNm para PA, PB1, PB2 y NP empleados en el método están en un plásmido o en dos o tres plásmidos diferentes.

Los métodos de producción de virus descritos en este documento, que no requieren infección por virus auxiliares, son útiles en estudios de mutagénesis viral y en la producción de vacunas (por ejemplo, para el SIDA, influenza, hepatitis B, hepatitis C, rinovirus, filovirus, malaria, herpes y fiebre aftosa) y vectores de terapia génica (por ejemplo, para cáncer, SIDA, adenosina desaminasa, distrofia muscular, deficiencia de ornitina transcarbamilasa y tumores del sistema nervioso central). Por lo tanto, en la presente invención se describe un virus para su uso en terapia médica (por ejemplo, para una vacuna o terapia génica).

Los polipéptidos virales aislados y los métodos de preparación y uso de virus recombinantes descritos anteriormente se describen en este documento. Los métodos incluyen administrar a un organismo huésped, por ejemplo, un mamífero, una cantidad eficaz del virus de la influenza descrito en este documento, por ejemplo, una preparación de virus inactivado, opcionalmente en combinación con un adyuvante y/o un vehículo, por ejemplo, en una cantidad eficaz para prevenir o mejorar la infección de un animal tal como un mamífero por ese virus o un virus estrechamente relacionado antigénicamente. El virus se puede administrar por vía intramuscular o intranasal. En algunos protocolos de dosificación, todas las dosis pueden administrarse por vía intramuscular o intranasal, mientras que en otros se emplea una combinación de administración intramuscular e intranasal. La vacuna puede contener además otros aislamientos del virus de la influenza, incluido el virus de la influenza recombinante, otro u otros patógenos, agentes biológicos adicionales o componentes microbianos, por ejemplo, para formar una vacuna multivalente. La vacunación intranasal, que contiene, por ejemplo, virus de la influenza inactivado y un adyuvante mucoso puede inducir IgA específica del virus y anticuerpo neutralizante en la nasofaringe, así como IgG sérica.

El virus de la influenza de la invención puede emplearse con otros antivirales, por ejemplo, amantadina, rimantadina y/o inhibidores de neuraminidasa, por ejemplo, pueden administrarse por separado junto con esos antivirales, por ejemplo, administrados antes, durante y/o después.

También se describe en el presente documento un método en el que el pH del medio, en el que se cultivan las células adecuadas para propagar el virus de la influenza, se altera durante la propagación del virus para permitir una replicación mejorada del virus de la influenza en esas células. Por lo tanto, para las células con endosomas tardíos que tienen un pH más alto que el de las células MDCK, alterar el pH del medio para mantener un pH más alto durante la replicación del virus a lo largo del tiempo, puede mejorar la producción de virus en ausencia de una proteína HA2 con un residuo característico, tal como como ácido aspártico, en una posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencia de nucleótidos para genes de PR8(Cambridge) (SEQ ID NOs: 10-15).

Figura 2. Propiedades de crecimiento del virus PR8 adaptado a células Vero en células Vero.

5 Figura 3. Comparación de las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre PR8 y PR8 adaptado a células Vero.

Figura 4. Propiedades de crecimiento de PR8 adaptado a células Vero, PR8 de "tipo silvestre" adaptado a células no Vero y virus recombinantes con una o dos sustituciones con respecto al virus de tipo silvestre en células Vero.

Figura 5. Propiedades de crecimiento del virus con N117D de HA2 y PR8 de tipo silvestre en células MDCK.

Figura 6. Estructura tridimensional de HA como un trímero (A), HA como un monómero (B) y HA2 (C).

10 Figura 7. Diagrama esquemático del ensayo de fusión que expresa HA de longitud completa.

Figura 8. Fotomicrografías de células Vero que expresan HA de PR8 de tipo silvestre o virus con N117D de HA2 en diversas condiciones de pH.

Figuras 9A-B. Sensibilidad al pH de los tintes Alexa647 y Oregon Green. A) La intensidad de la fluorescencia del tinte Oregon Green es sensible a las variaciones de pH mientras que la intensidad de la fluorescencia de Alexa647 no varía en un pH de 3 a 7. B) Diagrama esquemático del ensayo para detectar pH endosómico.

15 Figura 10. Comparación del pH endosómico en células MDCK y células Vero.

Figuras 11A-C. Los mutantes de sustitución con N117D de HA2 tienen títulos de infectividad mejorados en células Vero. A) Se infectaron células Vero con virus con N117D de HA2 A/Kawasaki/173/2001 (H1N1) y A/Kawasaki/173/2001 y se determinaron los títulos a lo largo del tiempo. B) Se infectaron células Vero con el virus con N117D de HA2 A/Kawasaki/UTK-4/2009 (H1N1) y A/Kawasaki/UTK-4/2009 y se determinaron los títulos a lo largo del tiempo. C) Se infectaron células Vero con el virus con N116D de HA2 A/Yokohama/2017/2003 (H3N2) y A/Yokohama/2017/2003 y se determinaron los títulos a lo largo del tiempo.

20 Figura 12. A) Alineación de secuencias HA2 de A/Aichi/2/68; A/Dk/Sing/97; A/HK/486/97; A/Sw/9/98; y A/HongKong/1073/99 (SEQ ID Nos. 16 a 20). B) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de HA de A/California/08/2009 (SEQ ID NO: 21). Las secuencias de HA2 corresponden a los residuos 336-566 (SEQ ID NO: 22).

25 Figura 13. Secuencias de HA2 para A/Kawasaki/173/2001, A/Kawasaki/UTK-4/2009 y A/Yokohama/2017/2003. De acuerdo con la base de datos del NCBI, las secuencias de HA2 del virus de la influenza para las HA H1, H2, H3, H5, H7 y H9 se conservaron generalmente en la posición 116 o 117 (N116 o N117) (más del 99%).

30 Descripción detallada de la invención

Definiciones

35 Como se usa en este documento, el término "aislado" se refiere a la preparación y/o aislamiento *in vitro* de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, vector o plásmido, péptido o polipéptido (proteína), o virus, de modo que no esté asociado con sustancias *in vivo*, o se purifica sustancialmente a partir de sustancias *in vitro*. Una preparación de virus aislada se obtiene generalmente por cultivo y propagación *in vitro*, y/o a través de pases en huevos, y está sustancialmente libre de otros agentes infecciosos.

40 Como se usa en el presente documento, "sustancialmente purificado" significa que la especie objetivo es la especie predominante, por ejemplo, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en una composición, y preferiblemente es al menos aproximadamente el 80% de la especie presente, y opcionalmente el 90% o más, por ejemplo, el 95%, 98%, 99% o más, de la especie presente en la composición.

45 Como se usa en este documento, "sustancialmente libre" significa por debajo del nivel de detección para un agente infeccioso particular usando métodos de detección estándar para ese agente.

50 Un virus "recombinante" es uno que ha sido manipulado *in vitro*, por ejemplo, usando técnicas de ADN recombinante, para introducir cambios en el genoma viral. Los virus reordenados se pueden preparar mediante técnicas recombinantes o no recombinantes.

55 Como se usa en este documento, el término "ácido nucleico recombinante" o "secuencia o segmento de ADN recombinante" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, a ADN, que se ha derivado o aislado de una fuente, que puede ser posteriormente alterado químicamente *in vitro*, de modo que su secuencia no es de origen natural, o corresponde a secuencias de origen natural que no están posicionadas como se colocarían en el genoma nativo. Un ejemplo de ADN "derivado" de una fuente sería una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil y que luego se sintetiza químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de dicho ADN "aislado" de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se escinde o elimina de dicha fuente por medios químicos, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de restricción, de modo que pueda manipularse adicionalmente, por ejemplo, amplificarse, para su uso en la invención, mediante la metodología de la ingeniería genética.

60 Como se usa en este documento, un gen o segmento de gen del virus de la influenza "heterólogo" proviene de una fuente de virus de la influenza que es diferente a la mayoría de los otros genes o segmentos de genes del virus de la influenza en un virus de la influenza recombinante, por ejemplo, reordenado.

65

Los términos "polipéptido aislado", "péptido aislado" o "proteína aislada" incluyen un polipéptido, péptido o proteína codificada por ADNc o ARN recombinante que incluye uno de origen sintético, o alguna combinación de los mismos.

El término "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" como se usa en este documento se refiere a una molécula de proteína expresada a partir de una molécula de ADN recombinante. Por el contrario, el término "proteína nativa" se usa en el presente documento para indicar una proteína aislada de una fuente de origen natural (es decir, una no recombinante). Pueden usarse técnicas de biología molecular para producir una forma recombinante de una proteína con propiedades idénticas en comparación con la forma nativa de la proteína.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera se puede realizar utilizando un algoritmo matemático.

Las implementaciones informáticas de estos algoritmos matemáticos se pueden utilizar para comparar secuencias para determinar la identidad de secuencia. Las alineaciones que utilizan estos programas se pueden realizar utilizando los parámetros predeterminados. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El algoritmo puede implicar la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen una puntuación T de umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabras vecinas. Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Luego, los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización por residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineación acumulada cae en la cantidad X de su valor máximo alcanzado, la puntuación acumulada llega a cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa, o se alcanza el final de cualquier secuencia.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también puede realizar un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST puede ser la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de prueba se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácido nucleico de prueba con la secuencia de ácido nucleico de referencia es menos de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

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

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en un ordenador, las coordenadas de las subsecuencias se designan si es necesario y los parámetros del programa del algoritmo de secuencia se designan. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

Estructura y propagación del virus de la influenza

Los virus de la influenza A poseen un genoma de ocho ARN virales de sentido negativo (ARNv) monocatenarios que codifican al menos diez proteínas. El ciclo de vida del virus de la influenza comienza con la unión de la hemaglutinina (HA) a los receptores que contienen ácido siálico en la superficie de la célula huésped, seguido de endocitosis mediada por receptores. El bajo pH en los endosomas tardíos desencadena un cambio conformacional en el HA, exponiendo así el extremo terminal N de la subunidad HA2 (el llamado péptido de fusión). El péptido de fusión inicia la fusión de la membrana viral y endosomal, y la proteína de la matriz (M1) y los complejos de RNP se liberan en el citoplasma. Los RNP consisten en la nucleoproteína (NP), que encapsida el ARNv, y el complejo de polimerasa viral, que está formado por las proteínas PA, PB1 y PB2. Los RNP se transportan al núcleo, en el que tiene lugar la transcripción y la replicación. El complejo de ARN polimerasa cataliza tres reacciones diferentes: síntesis de un ARNm con una caperuza 5' y una estructura poliA 3', de un ARN complementario de longitud completa (ARNc) y de ARNv genómico utilizando el ARNc como plantilla. Luego, los ARNv, las NP y las proteínas polimerasas recién sintetizadas se

ensamblan en los RNP, se exportan desde el núcleo y se transportan a la membrana plasmática, en la que se produce la gemación de las partículas del virus de la progenie. La proteína neuraminidasa (NA) juega un papel crucial al final de la infección al eliminar el ácido siálico de los sialiloligosacáridos, liberando así viriones recién ensamblados de la superficie celular y evitando la autoagregación de las partículas del virus. Aunque el ensamblaje del virus implica interacciones proteína-proteína y proteína-ARNv, la naturaleza de estas interacciones se desconoce en gran medida.

Aunque los virus de la influenza B y C son estructural y funcionalmente similares al virus de la influenza A, existen algunas diferencias. Por ejemplo, el virus de la influenza B no tiene una proteína M2 con actividad de canal iónico, pero tiene BM2 y tiene un segmento génico con secuencias de NA y NB. El virus de la influenza C tiene solo siete segmentos de genes.

Líneas celulares que pueden usarse en la presente invención

Cualquier célula, por ejemplo, cualquier célula de ave o mamífero, tal como una humana, por ejemplo, células 293T o PER.C6®, o canina, bovina equina, felina, porcina, ovina, de roedor, por ejemplo, de visón, por ejemplo, células MvLu1, o de hámster, por ejemplo, células CHO, o de primates no humanos, por ejemplo, células Vero, incluidas células mutantes, que soportan la replicación eficaz del virus de la influenza pueden emplearse para aislar y/o propagar virus de la influenza. Pueden usarse virus aislados para preparar un virus reordenado. Las células huésped para la producción de vacunas pueden ser líneas celulares o cepas celulares continuas de mamíferos o aves. Se puede realizar una caracterización completa de las células que se utilizarán, de modo que se puedan incluir las pruebas apropiadas para la pureza del producto final. Los datos que pueden usarse para la caracterización de una célula incluyen (a) información sobre su origen, derivación e historial de pases; (b) información sobre su crecimiento y características morfológicas; (c) resultados de pruebas de agentes adventicios; (d) características distintivas, tales como patrones bioquímicos, inmunológicos y citogenéticos que permiten que las células se reconozcan claramente entre otras líneas celulares; y (e) resultados de pruebas de tumorigenicidad. Puede ser preferible que el nivel de pases, o la duplicación de la población, de la célula huésped utilizada sea lo más baja posible.

Las células pueden ser líneas celulares continuas certificadas por la OMS o certificables. Los requisitos para certificar dichas líneas celulares incluyen la caracterización con respecto a al menos uno de genealogía, características de crecimiento, marcadores inmunológicos, susceptibilidad del virus, tumorigenicidad y condiciones de almacenamiento, así como mediante pruebas en animales, huevos y cultivo celular. Esta caracterización se usa para confirmar que las células están libres de agentes adventicios detectables. En algunos países, también puede ser necesaria la cariología. Además, la tumorigenicidad se puede probar en células que están al mismo nivel de pases que las utilizadas para la producción de vacunas. El virus puede purificarse mediante un proceso que se ha demostrado que produce resultados consistentes, antes de la producción de la vacuna (véase, por ejemplo, Organización Mundial de la Salud, 1982).

El virus producido por la célula huésped puede estar altamente purificado antes de la formulación de la vacuna o terapia génica. Generalmente, los procedimientos de purificación dan como resultado una eliminación extensa del ADN celular y otros componentes celulares y agentes adventicios. También se pueden utilizar procedimientos que degraden o desnaturalicen ampliamente el ADN.

Vacunas contra la influenza

Una vacuna de la invención incluye un virus de la influenza recombinante aislado de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas y, opcionalmente, uno o más virus aislados que incluyen otros virus de la influenza aislados, una o más proteínas inmunogénicas o glicoproteínas de uno o más virus de la influenza aislados o uno o más patógenos, por ejemplo, una proteína inmunogénica de una o más bacterias, virus que no son de la influenza, levaduras u hongos, o ácido nucleico aislado que codifica una o más proteínas virales (por ejemplo, vacunas de ADN) que incluyen una o más proteínas inmunogénicas del virus de la influenza aislado de la invención. En una realización, los virus de la influenza descritos en este documento pueden ser vectores de vacunas para el virus de la influenza u otros patógenos.

Una vacuna de virión completa puede concentrarse por ultrafiltración y luego purificarse por centrifugación zonal o por cromatografía. Los virus distintos del virus de la invención, tales como los incluidos en una vacuna multivalente, pueden inactivarse antes o después de la purificación utilizando formalina o beta-propiolactona, por ejemplo.

Una vacuna de subunidad comprende glicoproteínas purificadas. Una vacuna de este tipo se puede preparar de la siguiente manera: utilizando suspensiones víricas fragmentadas mediante tratamiento con detergente, los antígenos de superficie se purifican, por ejemplo mediante ultracentrifugación. Por lo tanto, las vacunas de subunidades contienen principalmente proteína HA y también NA. El detergente utilizado puede ser un detergente catiónico, por ejemplo, tal como bromuro de hexadecil trimetilamonio (Bachmeyer, 1975), un detergente aniónico tal como el desoxicolato de amonio (Laver y Webster, 1976); o un detergente no iónico tal como el que se comercializa con el nombre TRITON X100. La hemaglutinina también puede aislarse después del tratamiento de los viriones con una proteasa tal como bromelina y luego purificarse. La vacuna de subunidad se puede combinar con un virus atenuado de la invención en una vacuna multivalente.

Una vacuna fraccionada comprende viriones que se han sometido a tratamiento con agentes que disuelven los lípidos. Se puede preparar una vacuna fraccionada como sigue: una suspensión acuosa del virus purificado obtenido como antes, inactivado o no, se trata, bajo agitación, con disolventes lipídicos tales como éter etílico o cloroformo, asociados con detergentes. La disolución de los lípidos de la envoltura viral da como resultado la fragmentación de las partículas virales. Se recupera la fase acuosa que contiene la vacuna fraccionada, constituida principalmente por hemaglutinina y neuraminidasa con su entorno lipídico original eliminado, y el núcleo o sus productos de degradación. Luego, las partículas infecciosas residuales se inactivan si aún no se ha hecho. La vacuna fragmentada se puede combinar con un virus atenuado de la invención en una vacuna multivalente.

Vacunas inactivadas. Las vacunas del virus de la influenza inactivado se proporcionan inactivando el virus replicado usando métodos conocidos, tal como formalina o tratamiento con β -propiolactona. Los tipos de vacunas inactivadas pueden incluir vacunas de virus completo (WV) o vacunas subvirión (SV) (fragmentadas). La vacuna WV contiene virus inactivado intacto, mientras que la vacuna SV contiene virus purificado roto con detergentes que solubilizan la envoltura viral que contiene lípidos, seguido de inactivación química del virus residual.

Además, las vacunas pueden incluir aquellas que contienen las proteínas de superficie HA y NA aisladas, que se denominan vacunas de subunidad o antígeno de superficie.

Vacunas de virus vivos atenuados. Se pueden usar vacunas de virus de la influenza vivos atenuados, tales como las que incluyen un virus recombinante de la invención, para prevenir o tratar la infección por el virus de la influenza. La atenuación se puede lograr en una sola etapa mediante la transferencia de genes atenuados de un virus donante atenuado a un aislado replicado o virus reordenado de acuerdo con métodos conocidos. Dado que la resistencia al virus de la influenza A está mediada principalmente por el desarrollo de una respuesta inmune a las glicoproteínas HA y/o NA, los genes que codifican estos antígenos de superficie provienen de los virus reordenados o aislados clínicos. Los genes atenuados se derivan de un progenitor atenuado. En este enfoque, los genes que confieren atenuación generalmente no codifican las glicoproteínas HA y NA.

Se encuentran disponibles virus (virus de influenza de donantes) que son capaces de atenuar de manera reproducible los virus de influenza, por ejemplo, se puede usar un virus de donante adaptado al frío (ca) para la producción de vacunas atenuadas. Se pueden generar vacunas de virus reordenado vivo atenuado mediante el apareamiento del virus donante ca con un virus replicado virulento. La progenie reordenada se selecciona luego a 25 °C (restrictiva para la replicación del virus virulento), en presencia de un antisuero apropiado, que inhibe la replicación de los virus que portan los antígenos de superficie del virus donante ca atenuado. Los reordenamientos útiles son: (a) infecciosos, (b) atenuados para mamíferos no adultos seronegativos y mamíferos adultos inmunológicamente sensibilizados, (c) inmunogénicos y (d) genéticamente estables. La inmunogenicidad de los reordenamientos de ca es paralela a su nivel de replicación. Por lo tanto, la adquisición de los seis genes transferibles del virus donante ca por nuevos virus de tipo silvestre ha atenuado de forma reproducible estos virus para su uso en la vacunación de mamíferos susceptibles tanto adultos como no adultos.

Pueden introducirse otras mutaciones atenuantes en los genes del virus de la influenza mediante mutagénesis dirigida al sitio para rescatar virus infecciosos que portan estos genes mutantes. Pueden introducirse mutaciones atenuantes en regiones no codificantes del genoma, así como en regiones codificantes. Tales mutaciones atenuantes también pueden introducirse en genes distintos del HA o NA, por ejemplo, el gen de la polimerasa PB2. Por lo tanto, también se pueden generar nuevos virus donantes que porten mutaciones atenuantes introducidas por mutagénesis dirigida al sitio, y estos nuevos virus donantes se pueden usar en la producción de candidatos a vacunas reordenados vivos atenuados de una manera análoga a la descrita anteriormente para el virus donante ca. De manera similar, otras cepas de donantes atenuadas conocidas y adecuadas se pueden volver a clasificar con el virus de la influenza para obtener vacunas atenuadas adecuadas para su uso en la vacunación de mamíferos.

Los virus atenuados pueden mantener los genes del virus que codifican determinantes antígenicos sustancialmente similares a los de los aislados clínicos originales. Esto se debe a que el propósito de la vacuna atenuada es proporcionar sustancialmente la misma antigenicidad que el aislado clínico original del virus, mientras que al mismo tiempo carece de patogenicidad en la medida en que la vacuna causa una probabilidad mínima de inducir una enfermedad grave en los mamíferos vacunados.

Por lo tanto, los virus en una vacuna multivalente pueden atenuarse o inactivarse, formularse y administrarse, de acuerdo con métodos conocidos, tales como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un animal, por ejemplo, un mamífero. Los métodos son bien conocidos en la técnica para determinar si dichas vacunas atenuadas o inactivadas han mantenido una antigenicidad similar a la del aislado clínico o la cepa de alto crecimiento derivada del mismo. Tales métodos conocidos incluyen el uso de antisueros o anticuerpos para eliminar virus que expresan determinantes antígenicos del virus donante; selección química (por ejemplo, amantadina o rimantadina); actividad e inhibición de HA y NA; y selección de ácidos nucleicos (tal como hibridación de sonda o PCR) para confirmar que los genes donantes que codifican los determinantes antígenicos (por ejemplo, genes de HA o NA) no están presentes en los virus atenuados.

Composiciones Farmacéuticas

- Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, adecuadas para inoculación, por ejemplo, administración nasal, parenteral u oral, comprenden uno o más aislados del virus de la influenza, por ejemplo, uno o más virus de la influenza atenuados o inactivados, una subunidad de los mismos, proteína o proteínas aisladas de los mismos y/o ácido nucleico aislado que codifica una o más proteínas del mismo, que opcionalmente comprenden además soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Las composiciones pueden comprender además agentes auxiliares o excipientes, como se conoce en la técnica. La composición descrita en el presente documento se presenta generalmente en forma de dosis individuales (dosis unitarias).
- Las vacunas convencionales contienen generalmente alrededor de 0,1 a 200 µg, por ejemplo, 30 a 100 µg, de HA de cada una de las cepas que entran en su composición. La vacuna que forma el constituyente principal de la composición de vacuna descrita en este documento puede comprender un solo virus de la influenza, o una combinación de virus de la influenza, por ejemplo, al menos dos o tres virus de la influenza, incluyendo uno o más reordenantes.
- Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y/o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Se pueden usar portadores o vendajes oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel y mejorar la absorción de antígenos. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden comprender generalmente una solución de liposomas que contiene la forma de dosificación líquida. Las formas adecuadas para suspender liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua purificada. Además de los diluyentes inertes, tales composiciones también pueden incluir adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, saborizantes o perfumantes.
- Cuando una composición descrita en este documento se usa para la administración a un individuo, puede comprender además sales, tampones, adyuvantes u otras sustancias que sean deseables para mejorar la eficacia de la composición. Para las vacunas, se pueden usar adyuvantes, sustancias que pueden aumentar una respuesta inmune específica. Normalmente, el adyuvante y la composición se mezclan antes de la presentación al sistema inmunológico, o se presentan por separado, pero en el mismo sitio del organismo que se inmuniza.
- Puede proporcionarse heterogeneidad en una vacuna mezclando virus de la influenza replicados para al menos dos cepas de virus de la influenza, tales como 2 a 20 cepas o cualquier intervalo o valor en las mismas. Se pueden proporcionar vacunas para variaciones en una única cepa de un virus de la influenza, usando técnicas conocidas en el arte.
- Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender además o adicionalmente al menos un compuesto quimioterapéutico, por ejemplo, para terapia génica, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios o potenciadores inmunitarios y para vacunas, compuestos quimioterapéuticos que incluyen gammaglobulina, amantadina, guanidina, hidroxibencimidazol, interferón-α, interferón-β, interferón-γ, factor de necrosis tumoral alfa, tiosemicarbazonas, metisazona, rifampina, ribavirina, un análogo de pirimidina, un análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, didesoxinucleósidos, un inhibidor de la proteasa o ganciclovir.
- La composición también puede contener cantidades variables pero pequeñas de formaldehído libre de endotoxinas y conservantes, que se han encontrado seguros y que no contribuyen a efectos indeseables en el organismo al que se administra la composición.
- Fines farmacéuticos
- La administración de la composición (o los antisueros que provoca) puede ser con un propósito "profiláctico" o "terapéutico". Cuando se proporcionan de forma profiláctica, las composiciones descritas en el presente documento que son vacunas se proporcionan antes de que se manifieste cualquier síntoma o signo clínico de una infección por patógenos. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar cualquier infección posterior. Cuando se proporcionan de forma profiláctica, las composiciones de terapia génica descritas en el presente documento se proporcionan antes de que se manifieste cualquier síntoma o signo clínico de una enfermedad. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar uno o más síntomas o signos clínicos asociados con la enfermedad.
- Cuando se proporciona terapéuticamente, se proporciona una vacuna viral tras la detección de un síntoma o signo clínico de infección real. La administración terapéutica del compuesto o compuestos sirve para atenuar cualquier infección real. Cuando se proporciona terapéuticamente, se proporciona una composición de terapia génica tras la detección de un síntoma o signo clínico de la enfermedad. La administración terapéutica del o compuesto o compuestos sirve para atenuar un síntoma o signo clínico de esa enfermedad.
- Por lo tanto, una composición de vacuna descrita en el presente documento puede proporcionarse antes del inicio de la infección (para prevenir o atenuar una infección anticipada) o después del inicio de una infección real. De manera

similar, para la terapia génica, la composición se puede proporcionar antes de que se manifieste cualquier síntoma o signo clínico de un trastorno o enfermedad o después de que se detecten uno o más síntomas.

Se dice que una composición es "farmacológicamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un mamífero receptor. Se dice que dicho agente se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Una composición descrita en el presente documento es fisiológicamente significativa si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor, por ejemplo, potencia al menos una respuesta inmune humoral o celular primaria o secundaria contra al menos una cepa de un virus de influenza infeccioso.

La "protección" proporcionada no necesita ser absoluta, es decir, la infección por influenza no necesita ser prevenida o erradicada totalmente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control o un grupo de mamíferos. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o la rapidez de aparición de los síntomas o signos clínicos de la infección por el virus de la influenza.

Administración farmacéutica

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

Se puede proporcionar una vacuna a una hembra de mamífero (en o antes del embarazo o parto), en condiciones de tiempo y cantidad suficientes para provocar la producción de una respuesta inmune que sirve para proteger tanto a la hembra como al feto o al recién nacido (mediante la incorporación pasiva de los anticuerpos a través de la placenta o en la leche materna).

Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos para prevenir o atenuar un trastorno o enfermedad, por ejemplo, una infección por al menos una cepa de patógeno. Como se usa en este documento, se dice que una vacuna previene o atenúa una enfermedad si su administración da como resultado la atenuación total o parcial (es decir, la supresión) de un signo clínico o condición de la enfermedad, o en la inmunidad total o parcial del individuo a la enfermedad. Como se usa en este documento, se dice que una composición de terapia génica previene o atenúa una enfermedad si su administración da como resultado la atenuación total o parcial (es decir, la supresión) de un signo clínico o condición de la enfermedad, o en la inmunidad total o parcial del individuo a la enfermedad.

Una composición que tiene al menos un virus de la influenza de la presente invención, que incluye uno que está atenuado y uno o más de otros virus aislados, una o más de sus proteínas virales aisladas, una o más moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una o más de sus proteínas virales, o una combinación de los mismos, puede administrarse por cualquier medio que logre los propósitos pretendidos.

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

Un régimen típico para prevenir, suprimir o tratar una patología relacionada con el virus de la influenza comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de vacuna como se describe en este documento, administrada como un tratamiento único o repetida como dosis potenciadora o de refuerzo, durante un período de hasta y que incluye entre una semana y aproximadamente 24 meses, o cualquier intervalo o valor en el mismo.

Una "cantidad eficaz" de una composición es aquella que es suficiente para conseguir el efecto deseado. Se entiende que la dosis eficaz puede depender de la especie, la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces que se proporcionan a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis.

La dosis de una vacuna de virus vivo, atenuado o muerto para un animal tal como un organismo mamífero adulto puede ser de aproximadamente 10^2 - 10^{15} , por ejemplo, 10^3 - 10^{12} , unidades formadoras de plaquetas (PFU)/kg, o cualquier intervalo o valor en el mismo. La dosis de vacuna inactivada puede variar de aproximadamente 0,1 a 1000, por ejemplo, 30 a 100 µg, de proteína HA. Sin embargo, la dosis debe ser una cantidad segura y eficaz determinada por métodos convencionales, utilizando las vacunas existentes como punto de partida.

La dosis de HA inmunorreactiva en cada dosis de vacuna de virus replicado puede estandarizarse para contener una cantidad adecuada, por ejemplo, de 30 a 100 µg o cualquier intervalo o valor en el mismo, o la cantidad recomendada por agencias gubernamentales u organizaciones profesionales reconocidas. La cantidad de NA también se puede estandarizar, sin embargo, esta glicoproteína puede ser lábil durante la purificación y el almacenamiento.

La dosis de HA inmunorreactiva en cada dosis de vacuna de virus replicado se puede estandarizar para contener una cantidad adecuada, por ejemplo, 1-50 µg o cualquier intervalo o valor en el mismo, o la cantidad recomendada por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos (PHS), que suele ser de 15 µg por componente para niños mayores de 3 años y de 7,5 µg por componente para niños mayores menores de 3 años de edad. La cantidad de NA también se puede estandarizar, sin embargo, esta glicoproteína puede ser lábil durante el proceso de purificación y almacenamiento (Kendal et al., 1980; Kerr et al., 1975). Cada dosis de 0,5 mL de vacuna puede contener aproximadamente entre 1 y 50 mil millones de partículas de virus, y preferiblemente 10 mil millones de partículas.

Los productos y métodos descritos en este documento se describirán mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Métodos

Células y virus

Se mantienen células de riñón embrionario humano 293T en medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero de ternero fetal al 10% y antibióticos. Las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) se cultivan en MEM con suero de ternero recién nacido al 5% y antibióticos. Las células Vero WCB de mono verde africano, que se establecieron después de pruebas de bioseguridad para su uso en la producción de vacunas humanas (Sugawara et al., 2002), se mantienen en medio VP-SFM sin suero (GIBCO-BRL) con antibióticos. Las células se mantienen a 37 °C en CO₂ al 5%. Un virus semilla de vacuna recomendado por la OMS es NIBRG-14.

Construcción de plásmidos y genética inversa

Para generar reordenamientos de virus de la influenza A, se usa una genética inversa basada en plásmidos (Neumann et al., 1999). Los ADNc de longitud completa se clonaron en un plásmido bajo el control del promotor de la polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón (plásmidos Poll).

Se utiliza una serie de constructos Poll producidos previamente, derivados de cepas A/WSN/33 (H5N1; WSN) o PR8, para genética inversa (Horimoto et al., 2006; Neumann et al., 1999). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) como virus donante, debido a su seguridad en humanos (Wood & Robertson, 2004; Webby & Webster, 2003).

Plásmidos que expresan WSN o NP, PA, PB1 o PB2 de PR8 bajo el control del promotor de β-actina de pollo se utilizan para todos los experimentos de genética inversa (Horimoto et al., 2006; Neumann et al., 1999). En resumen, los plásmidos Poll y los plásmidos de expresión de proteínas se mezclan con un reactivo de transfección, Trans-IT 293T (Panvera), se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se añaden a las células 293T. Las células transfectadas se incuban en Opti-MEM I (GIBCO-BRL) durante 48 horas. Para la genética inversa en células Vero WCB, se usa un electroporador (Amaxa) para transfectar las mezclas de plásmidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dieciséis horas después de la transfección, se añadieron células Vero WCB recién preparadas a las células transfectadas y se añadió TPCK-tripsina (1 µg/mL) al cultivo 6 horas después. Las células transfectadas se incuban en VP-SFM sin suero durante un total de 4 días. Los sobrenadantes que contienen virus infecciosos se recolectan y pueden clonarse biológicamente mediante dilución limitante.

Se preparó un virus recombinante que tenía los genes HA y NA de A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) y el resto de los genes del virus de la influenza tipo A de PR8(UW). El título del virus recombinante fue 10^{10,67} EID₅₀/mL y el título de HA fue 1:1600.

Tabla 1

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

Las secuencias de genes de PR8(UW) son las siguientes:

PA

AGCGAAAGCA GGTACTGATC CAAAATGGAA GATTTTGTGC GACAATGCTT
 CAATCCGATG ATTGTGAGC TTGCGGAAAA AACAATGAAA GAGTATGGGG
 AGGACCTGAA AATCGAAACA AACAAATTTG CAGCAATATG CACTCACTTG
 GAAGTATGCT TCATGTATTG AGATTTTCAC TTCATCAATG AGCAAGGCCA
 GTCAATAATC GTAGAACTTG GTGATCCAAA TGCACTTTGG AAGCACAGAT
 TTGAAATAAT CGAGGGAAGA GATCGCACAA TGGCCTGGAC AGTAGTAAAC
 AGTATTTGCA AACTACAGG GGCTGAGAAA CCAAAGTTTC TACCAGATTT
 GTATGATTAC AAGGAGAATA GATTCATCGA AATTGGAGTA ACAAGGAGAG
 AAGTTCACAT ATACTATCTG GAAAAGGCCA ATAAAATTAA ATCTGAGAAA
 ACACACATCC ACATTTTCTC GTTCACTGGG GAAGAAATGG CCACAAAGGC
 AGACTACACT CTCGATGAAG AAAGCAGGGC TAGGATCAAA ACCAGACTAT
 TCACCATAAG ACAAGAAATG GCCAGCAGAG GCCTCTGGGA TTCCTTTCTG
 CAGTCCGAGA GAGGAGAAGA GACAATTGAA GAAAGGTTTG AAATCAGAG
 AACAAATGCGC AAGCTTGCCG ACCAAAGTCT CCCGCCGAAC TTCTCCAGCC
 TTGAAAATTT TAGAGCCTAT GTGGATGGAT TCGAACCGAA CGGCTACATT
 GAGGGCAAGC TGTCTCAAAT GTCCAAAGAA GTAAATGCTA GAATTGAACC
 TTTTGTGAAA ACAACACCAC GACCACTTAG ACTTCCGAAT GGGCCTCCCT
 GTTCTCAGCG GTCCAAATTC CTGCTGATGG ATGCCTTAAA ATTAAGCATT
 GAGGACCCAA GTCATGAAGG AGAGGGAATA CCGCTATATG ATGCAATCAA
 ATGCAATGAGA ACATTTCTTG GATGGAAGGA ACCCAATGTT GTTAAACCAC
 ACGAAAAGGG AATAAATCCA AATTATCTTC TGTCATGGAA GCAAGTACTG
 GCAGAACTGC AGGACATTGA GAATGAGGAG AAAATTCCAA AGACTAAAAA
 TATGAAGAAA ACAAGTCAGC TAAAGTGGGC ACTTGGTGAG AACATGGCAG
 CAGAAAAGGT AGACTTTGAC GACTGTAAAG ATGTAGGTGA TTTGAAGCAA
 TATGATAGTG ATGAACCAGA ATTGAGGTCG CTTGCAAGTT GGATTGAGAA
 TGAGTTTAAAC AAGGCATGCG AACTGACAGA TTCAAGCTGG ATAGAGCTCG
 ATGAGATTGG AGAAGATGTG GCTCCAATTG AACACATTGC AAGCATGAGA
 AGGAATTATT TCACATCAGA GGTGTCTCAC TGCAGAGCCA CAGAATACAT
 AATGAAGGGA GTGTACATCA ATACTGCCTT GCTTAATGCA TCTTGTGCAG

CAATGGATGA TTTCCAATTA ATTCCAATGA TAAGCAAGTG TAGAACTAAG
 GAGGGAAGGC GAAAGACCAA CTTGTATGGT TTCATCATAA AAGGAAGATC
 CCACTTAAGG AATGACACCG ACGTGGTAAA CTTTGTGAGC ATGGAGTTTT
 CTCTCACTGA CCAAGACTT GAACACATA AATGGGAGAA GTACTGTGTT
 CTTGAGATAG GAGATATGCT TATAAGAACT GCCATAGGCC AGGTTTCAAG
 GCCCATGTTT TGTATGTGA GAACAAATGG AACCTCAAAA ATTAATAATGA
 AATGGGGAAT GGAGATGAGG CGTTGCCTCC TCCAGTCACT TCAACAAAT
 GAGAGTATGA TTGAAGCTGA GTCCTCTGTC AAAGAGAAAAG ACATGACCAA
 AGAGTTCTTT GAGAACAAAT CAGAAACATG GCCCATTGGA GAGTCCCCCA
 AAGGAGTGGA GGAAAGTTCC ATTGGGAAGG TCTGCAGGAC TTTATTAGCA
 AAGTCGGTAT TCAACAGCTT GTATGCATCT CCACAACCTAG AAGGATTTTC
 AGCTGAATCA AGAAAACCTG TTCTTATCGT TCAGGCTCTT AGGGACAACC
 TGGAACCTGG GACCTTTGAT CTTGGGGGGC TATATGAAGC AATTGAGGAG
 TGCTGATTA ATGATCCCTG GGTTTTGCTT AATGCTTCTT GTTCAACTC
 CTTCTTACA CATGCATTGA GTTAGTTGTG GCAGTGCTAC TATTTGCTAT
 CCATACTGTC CAAAAAGTA CCTTGTTTCT ACT
 (SEQ ID NO:1)

PB1

AGCGAAAGCA GGCAAACCAT TTGAATGGAT GTCAATCCGA
 CCTTACTTTT CTAAAAAGTG CCAGCACAAA ATGCTATAAG CACAACTTTC
 CCTTATACTG GAGACCTTCC TTACAGCCAT GGGACAGGAA CAGGATACAC
 CATGGATACT GTCAACAGGA CACATCAGTA CTCAGAAAAG GGAAGATGGA
 CAACAAACAC CGAAACTGGA GCACCGCAAC TCAACCCGAT TGATGGGCCA
 CTGCCAGAAG ACAATGAACC AAGTGGTTAT GCCCAAACAG ATTGTGTATT
 GGAGGCGATG GCTTTCCTTG AGGAATCCCA TCCTGGTATT TTTGAAAAC
 CGTGTATTGA AACGATGGAG GTTGTTCAGC AAACACGAGT AGACAAGCTG
 ACACAAGGCC GACAGACCTA TGAAGTGGTCTAATAAGTAA ACCAACCTGC
 TGCAACAGCA TTGGCCAACA CAATAGAAGT GTTCAGATCA AATGGCCTCA
 CGGCCAATGA GTCTGGAAGG CTCATAGACT TCCTTAAGGA TGTAATGGAG
 TCAATGAACA AAGAAGAAAT GGGGATCACA ACTCATTTC AGAGAAAGAG
 ACGGGTGAGA GACAATATGA CTAAGAAAAT GATAACACAG AGAACAATGG
 GTAAAAAGAA GCAGAGATTG AACAAAAGGA GTTATCTAAT TAGAGCATTG
 ACCCTGAACA CAATGACCAA AGATGCTGAG AGAGGGAAGC TAAAACGGAG
 AGCAATTGCA ACCCCAGGGA TGCAATAAG GGGGTTTGTA TACTTTGTTG
 AGACACTGGC AAGGAGTATA TGTGAGAAAC TTGAACAATC AGGGTTGCCA
 GTTGGAGGCA ATGAGAAGAA AGCAAAGTTG GCAAATGTTG TAAGGAAGAT
 GATGACCAAT TCTCAGGACA CCGAACTTTC TTTCACCATC ACTGGAGATA
 ACACCAAATG GAACGAAAAT CAGAATCCTC GGATGTTTT GGCCATGATC
 ACATATATGA CCAGAAATCA GCCCGAATGG TTCAGAAATG TTCTAAGTAT
 TGCTCCAATA ATGTTCTCAA ACAAATGGC GAGACTGGGA AAAGGGTATA
 TGTTTGAGAG CAAGAGTATG AACTTAGAA CTCAAATACC TGCAGAAATG
 CTAGCAAGCA TCGATTTGAA ATATTTCAAT GATTCAACAA GAAAGAAGAT
 TGAAAAATC CGACCGCTCT TAATAGAGGG GACTGCATCA TTGAGCCCTG
 GAATGATGAT GGGCATGTTT AATATGTAA GCACTGTATT AGGCGTCTCC
 ATCCTGAATC TTGGACAAA GAGATACACC AAGACTACTT ACTGGTGGGA
 TGGTCTTCAA TCCTCTGACG ATTTTGTCTT GATTGTGAAT GCACCCAATC
 ATGAAGGGAT TCAAGCCGGA GTCGACAGGT TTTATCGAAC CTGTAAGCTA
 CTTGGAATCA ATATGAGCAA GAAAAAGTCT TACATAAACA GAACAGGTAC
 ATTTGAATC ACAAGTTTTT TCTATCGTTA TGGGTTTGT GCCAATTTCA
 GCATGGAGCT TCCAGTTTT GGGGTGTCTG GGATCAACGA GTCAGCGGAC
 ATGAGTATTG GAGTTACTGT CATCAAAAC AATATGATAA ACAATGATCT
 TGGTCCAGCA ACAGCTCAAA TGGCCCTTCA GTTGTTCATC AAAGATTACA
 GGTACACGTA CCGATGCCAT ATAGGTGACA CACAAATACA AACCAGAAGA
 TCATTTGAAA TAAAGAACT GTGGGAGCAA ACCCGTTCCA AAGCTGGACT
 GCTGGTCTCC GACGGAGGCC CAAATTTATA CAACATTAGA AATCTCCACA
 TTCCTGAAGT CTGCCTAAAA TGGGAATTGA TGGATGAGGA TTACCAGGGG
 CGTTTATGCA ACCCACTGAA CCCATTGTG AGCCATAAAG AAATTGAATC

AATGAACAAT GCAGTGATGA TGCCAGCACA TGGTCCAGCC AAAAATCGG
 AGTATGATGC TGTGCAACA ACACACTCCT GGATCCCCAA AAGAAATCGA
 TCCATCTTGA ATACAAGTCA AAGAGGAGTA CTTGAGGATG AACAAATGTA
 CCAAAGGTGC TGCAATTTAT TTGAAAAATT CTTCCCAGC AGTTCATACA
 GAAGACCACT CGGGATATCC AGTATGGTGG AGGCTATGGT TTCCAGAGCC
 CGAATTGATG CACGGATTGA TTTCAATCT GGAAGGATAA AGAAAGAAGA
 GTTCACTGAG ATCATGAAGA TCTGTTCCAC CATTGAAGAG CTCAGACGGC
 AAAAATAGTG AATTTAGCTT GTCCTTCATG AAAAAATGCC TTGTTTCTAC

T
 (SEQ ID NO:2)

PB2

AGCGAAAGCA GGTCAATTAT ATTCAATATG GAAAGAATAA AAGAACTACG
 AAATCTAATG TCGCAGTCTC GCACCCGCGA GATACTCACA AAAACCACCG
 TGGACCATAT GGCCATAATC AAGAAGTACA CATCAGGAAG ACAGGAGAAG
 AACCCAGCAC TTAGGATGAA ATGGATGATG GCAATGAAAT ATCCAATTAC
 AGCAGACAAG AGGATAACGG AAATGATTCC TGAGAGAAAT GAGCAAGGAC
 AAACTTTATG GAGTAAATG AATGATGCCG GATCAGACCG AGTGATGGTA
 TCACCTCTGG CTGTGACATG GTGGAATAGG AATGGACCAA TAACAAATAC
 AGTTCATTAT CCAAAAATCT ACAAACCTTA TTTTGAAAGA GTCGAAAGGC
 TAAAGCATGG AACCTTTGGC CCTGTCCATT TTAGAAACCA AGTCAAAATA
 CGTCGGAGAG TTGACATAAA TCCTGGTCAT GCAGATCTCA GTGCCAAGGA
 GGCACAGGAT GTAATCATGG AAGTTGTTTT CCCTAACGAA GTGGGAGCCA
 GGATACTAAC ATCGGAATCG CAACTAACGA TAACCAAAGA GAAGAAAGAA
 GAAGTCCAGG ATTGCAAAAT TTCTCCTTTG ATGGTTGCAT ACATGTTGGA
 GAGAGAACTG GTCCGCAAAA CGAGATTCTT CCCAGTGGCT GGTGGAACAA
 GCAGTGTGTA CATTGAAGTG TTGCATTGTA CTCAAGGAAC ATGCTGGGAA
 CAGATGTATA CTCCAGGAGG GGAAGTGAGG AATGATGATG TTGATCAAAG
 CTTGATTATT GCTGCTAGGA ACATAGTGAG AAGAGCTGCA GTATCAGCAG
 ATCCACTAGC ATCTTTATTG GAGATGTGCC ACAGCACACA GATTGGTGGA
 ATTAGGATGG TAGACATCCT TAGGCAGAAC CCAACAGAA AGCAAGCCGT
 GGATATATGC AAGGCTGCAA TGGGACTGAG AATTAGCTCA TCCTTCAGTT
 TTGGTGGATT CACATTTAAG AGAACAAGCG GATCATCAGT CAAGAGAGAG
 GAAGAGGTGC TTACGGGCAA TCTTCAAACA TTGAAGATAA GAGTGCATGA
 GGGATATGAA GAGTTCACAA TGGTTGGGAG AAGAGCAACA GCCATACTCA
 GAAAAGCAAC CAGGAGATTG ATTCAGCTGA TAGTGAGTGG GAGAGACGAA
 CAGTCGATTG CCGAAGCAAT AATTGTGGCC ATGGTATTTT CACAAGAGGA
 TTGTATGATA AAAGCAGTCA GAGGTGATCT GAATTTCTGC AATAGGGCGA
 ATCAACGATT GAATCCTATG CATCAACTTT TAAGACATTT TCAGAAGGAT
 GCGAAAGTGC TTTTTCAAAA TTGGGGAGTT GAACCTATCG ACAATGTGAT
 GGGAAATGATT GGGATATTGC CCGACATGAC TCCAAGCATC GAGATGTCAA
 TGAGAGGAGT GAGAATCAGC AAAATGGGTG TAGATGAGTA CTCCAGCACG
 GAGAGGGTAG TGGTGAGCAT TGACCGTTTT TTGAGAATCC GGGACCAACG
 AGGAAATGTA CTAAGTCTC CCGAGGAGGT CAGTGAAACA CAGGGAACAG
 AGAAACTGAC AATAACTTAC TCATCGTCAA TGATGTGGGA GATTAATGGT
 CCTGAATCAG TGTTGGTCAA TACCTATCAA TGGATCATCA GAACTGGGA
 AACTGTAAAA ATTCAGTGGT CCCAGAACCC TACAATGCTA TACAATAAAA
 TGGAATTTGA ACCATTTTCA TCTTTAGTAC CTAAGGCCAT TAGAGGCCAA
 TACAGTGGGT TTGTAAGAAC TCTGTTCCAA CAAATGAGGG ATGTGCTTGG
 GACATTTGAT ACCGCACAGA TAATAAACT TCTTCCCTTC GCAGCCGCTC
 CACCAAAGCA AAGTAGAATG CAGTTCTCCT CATTTACTGT GAATGTGAGG
 GGATCAGGAA TGAGAATACT TGTAAGGGGC AATTCTCCTG TATTCAACTA
 TAACAAGGCC ACGAAGAGAC TCACAGTTCT CGGAAAGGAT GCTGGCACTT
 TAACTGAAGA CCCAGATGAA GGCACAGCTG GAGTGGAGTC CGCTGTTCTG
 AGGGGATTCC TCATTCTGGG CAAAGAAGAC AAGAGATATG GGCCAGCACT
 AAGCATCAAT GAAGTAGCA ACCTTGCGAA AGGAGAGAAG GCTAATGTGC
 TAATTGGGCA AGGAGACGTG GTGTTGGTAA TGAACGGAA ACGGGACTCT

 AGCATACTTA CTGACAGCCA GACAGCGACC AAAAGAATTC GGATGGCCAT
 CAATTAGTGT CGAATAGTTT AAAACGACC TTGTTTCTAC T
 (SEQ ID NO:3)

NP

AGCAAAAGCA GGGTAGATAA TCACTCACTG AGTGACATCA
 AAATCATGGC GTCTCAAGGC ACCAAACGAT CTTACGAACA GATGGAGACT
 GATGGAGAAC GCCAGAATGC CACTGAAATC AGAGCATCCG TCGGAAAAAT
 GATTGGTGGA ATTGGACGAT TCTACATCCA AATGTGCACC GAACTCAAAC
 TCAGTGATTA TGAGGGACGG TTGATCCAAA ACAGCTTAAC AATAGAGAGA
 ATGGTGCTCT CTGCTTTTGA CGAAAGGAGA AATAAATACC TTGAAGAACA
 TCCCAGTGCG GGGAAAGATC CTAAGAAAAC TGGAGGACCT ATATACAGGA
 GAGTAAACGG AAAGTGGATG AGAGAACTCA TCCTTTATGA CAAAGAAGAA
 ATAAGGCGAA TCTGGCGCCA AGCTAATAAT GGTGACGATG CAACGGCTGG
 TCTGACTCAC ATGATGATCT GGCATTCCAA TTTGAATGAT GCAACTTATC
 AGAGGACAAG AGCTCTTGTT CGCACCGGAA TGGATCCCAG GATGTGCTCT
 CTGATGCAAG GTTCAACTCT CCCTAGGAGG TCTGGAGCCG CAGGTGCTGC
 AGTCAAAGGA GTTGAACAA TGGTGATGGA ATTGGTCAGA ATGATCAAAC
 GTGGGATCAA TGATCGGAAC TTCTGGAGGG GTGAGAATGG ACGAAAAACA
 AGAATTGCTT ATGAAAGAAT GTGCAACATT CTCAAAGGGA AATTTCAAAC
 TGCTGCACAA AAAGCAATGA TGGATCAAGT GAGAGAGAGC CGGAACCCAG
 GGAATGCTGA GTTCGAAGAT CTCACTTTTT TAGCACGGTC TGCACATATA
 TTGAGAGGGT CGGTTGCTCA CAAGTCCTGC CTGCCTGCCT GTGTGTATGG
 ACCTGCCGTA GCCAGTGGGT ACGACTTTGA AAGGGAGGGA TACTCTCTAG
 TCGGAATAGA CCCTTTTACA CTGCTTCAAA ACAGCCAAGT GTACAGCCTA
 ATCAGACCAA ATGAGAATCC AGCACACAAG AGTCAACTGG TGTGGATGGC
 ATGCCATTCT GCCGCATTTG AAGATCTAAG AGTATTAAGC TTCATCAAG
 GGACGAAGGT GCTCCCAAGA GGAAGCTTT CCACTAGAGG AGTTCAAAT
 GCTTCCAATG AAAATATGGA GACTATGGAA TCAAGTACAC TTGAAGTGA
 AAGCAGGTAC TGGGCCATAA GGACCAGAAG TGGAGGAAAC ACCAATCAAC
 AGAGGGCATC TCGGGGCCAA ATCAGCATAA AACCTACGTT CTCAGTACAG
 AGAAATCTCC CTTTTGACAG AACCAACCATT ATGGCAGCAT TCAATGGGAA
 TACAGAGGGG AGAACATCTG ACATGAGGAC CGAAATCATA AGGATGATGG
 AAAGTGCAAG ACCAGAAGAT GTGTCTTTCC AGGGGCGGGG AGTCTTCGAG
 CTCTCGGACG AAAAGGCAGC GAGCCCGATC GTGCCTTCTT TTGACATGAG
 TAATGAAGGA TCTTATTTCT TCGGAGACAA TGCAGAGGAG TACGACAATT
 AAAGAAAAAT ACCCTTGTTT TCACT
 (SEQ ID NO:4)

M

AGCAAAAGCA GGTAGATATT GAAAGATGAG TCTTCTAACC GAGGTCGAAA
 CGTACGTA CTCTATCATC CCGTCAGGCC CCCTCAAAGC CGAGATCGCA
 CAGAGACTTG AAGATGTCTT TGCAGGGAAG AACACCGATC TTGAGGTTCT
 CATGGAATGG CTAAAGACAA GACCAATCCT GTCACCTCTG ACTAAGGGGA
 TTTTAGGATT TGTGTTACG CTCACCGTGC CCAAGTACG AGGACTGCAG
 CGTAGACGCT TTGTCCAAAA TGCCCTTAAT GGAACGGGG ATCCAAATAA
 CATGGACAAA GCAGTTAAAC TGTATAGGAA GCTCAAGAGG GAGATAACAT
 TCCATGGGGC CAAAGAAATC TCACTCAGTT ATTCTGCTGG TGCACTTGCC
 AGTTGTATGG GCCTCATATA CAACAGGATG GGGGCTGTGA CCACTGAAGT
 GGCATTTGGC CTGGTATGTG CAACCTGTGA ACAGATTGCT GACTCCAGC
 ATCGGTCTCA TAGGCAATG GTGACAACAA CCAATCCACT AATCAGACAT
 GAGAACAGAA TGTTTTAGC CAGCACTACA GCTAAGGCTA TGGAGCAAT
 GGCTGGATCG AGTGAGCAAG CAGCAGAGGC CATGGAGGTT GCTAGTCAGG
 CTAGACAAAT GGTGCAAGCG ATGAGAACCA TTGGGACTCA TCCTAGCTCC
 AGTGCTGGTC TGAAAAATGA TCTTCTTGA AATTTGCAGG CCTATCAGAA
 ACGAATGGGG GTGCAGATGC AACGGTTCAA GTGATCCTCT CACTATTGCC

 GCAAAATATCA TTGGGATCTT GCACTTGACA TTGTGGATTG TTGATCGTCT
 TTTTTTCAA TGCAATTTACC GTCGCTTTAA ATACGGACTG AAAGGAGGGC
 CTCTACGGA AGGAGTGCCA AAGTCTATGA GGAAGAATA TCGAAAGGAA
 CAGCAGAGTG CTGTGGATGC TGACGATGGT CATTTTGTCA GCATAGAGCT
 GGAGTAAAAA ACTACCTTGT TTCTACT
 (SEQ ID NO:5)

NS

AGCAAAAGCA GGGTGACAAA AACATAATGG ATCCAAACAC TGTGTCAAGC
 TTTCAGGTAG ATTGCTTTCT TTGGCATGTC CGCAAACGAG TTGCAGACCA
 AGAACTAGGC GATGCCCCAT TCCTTGATCG GCTTCGCCGA GATCAGAAAT
 CCCTAAGAGG AAGGGGCAGT ACTCTCGGTC TGGACATCAA GACAGCCACA
 CGTGCTGGAA AGCAGATAGT GGAGCGGATT CTGAAAGAAG AATCCGATGA
 GGCACCTAAA ATGACCATGG CCTCTGTACC TGCCTCGCGT TACCTAACTG
 ACATGACTCT TGAGGAAATG TCAAGGGACT GGTCCATGCT CATACCCAAG
 CAGAAAGTGG CAGGCCCTCT TTGTATCAGA ATGGACCAGG CGATCATGGA
 TAAGAACATC ATACTGAAAG CGAACTTCAG TGTGATTTT GACCGGCTGG
 AGACTCTAAT ATTGCTAAGG GCTTTCACCG AAGAGGGAGC AATTGTTGGC
 GAAATTTTAC CATTGCCTTC TCTTCCAGGA CATACTGCTG AGGATGTCAA
 AAATGCAGTT GGAGTCCTCA TCGGAGGACT TGAATGGAAT GATAACACAG
 TTCGAGTCTC TGAAACTCTA CAGAGATTCTG CTGGGAGAAG CAGTAATGAG
 AATGGGAGAC CTCCACTCAC TCCAAAACAG AAACGAGAAA TGGCGGGAAC
 AATTAGGTCA GAAGTTTGAA GAAATAAGAT GGTGATTGA AGAAGTGAGA
 CACAACTGA AGATAACAGA GAATAGTTT GAGCAAATAA CATTATGCA
 AGCCTTACAT CTATTGCTTG AAGTGGAGCA AGAGATAAGA ACTTCTCGT
 TTCAGCTTAT TTAGTACTAA AAAACACCCT TGTTTCTACT
 (SEQ ID NO:6)

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAAATAAAACAACCAAAATGAAGGCAAACCTACTGGTCCTGTTATGTGCACTTGC
 AGCTGCAGAT
 GCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACCAATTCAACCGACACTGTTGACACAGTACTCGAGAAGA
 ATGTGACAGT
 GACACACTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGCCACAACGGAAAACCTATGTAGATTAAGGAATAGCCCCA
 CTACAATTGG
 GGAAATGTAACATCGCCGGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAATGCGACCCACTGCTTCCAGTGAGATCAT
 GGTCTACATT
 GTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTTCATCGACTATGAGGAGCTGAGGG
 AGCAATTGAG
 CTCAGTGTATCATTTGAAAGATTGCAAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACAACACAAAC
 GGAGTAACGG
 CAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGAGAAGGAGGGCT
 CATACCCAAAG
 CTGAAAAATTTCTTATGTGAACAAAAAAGGGAAAGAAGTCCTGTACTGTGGGTATTTCATCACCCGCCTA
 ACAGTAAGGA
 ACAACAGAATCTCTATCAGAATGAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGACTTCAAATTATAACAGGAGATTTA
 CCCCAGAA
 TAGCAGAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTATTACTGGACCTTGCTAAAACCCG
 GAGACACAATA
 ATATTTGAGGCAAAATGGAATCTAATAGCACCAATGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCG
 GCATCATCAC
 CTCAAACGCATCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGTAACACCCCTGGGAGCTATAACAGCAGTCTC
 CCTTACCAGA
 ATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCCAAATACGTGAGGAGTGCCAAATTGAGGATGGTTACAG
 GACTAAGGAAC
 ATTCGCTCCATTCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCCGTTTTATTGAAGGGGGATGGACTGGAA
 TGATAGATGG

ATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAGCGGATCAAAAAAGCACACAAAAT
 GCCATTAACG
 GGATTACAAACAAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAAATGAACATTCAATTCACAGCTGTGGGTAAAGAATT
 CAACAAATTA
 GAAAAAAGGATGGAAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTCTGGACATTTGGACATATAATGCAGA
 ATTGTTAGT
 TCTACTGGAAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCATGACTCAAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAA
 GCCAATTAA
 AGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCTACCACAAGGTGACAATGAATGCATGGA
 AAGTGTAAGA
 AATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAACAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGA
 AATTGGAATC
 AATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTGCCAGTTCAGTGGTGCTTTTGGTCTCCCTG
 GGGGCAATCA
 GTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTCAGTGCAGAAATATGCATCTGAGATTAGAATTCAGAGATATG
 AGGAAAAAC
 ACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:7)

NA

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAACCATTGGATCAATCTGTCTGGTAGTC
 GGACTAATT
 AGCCTAATATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCATTCAATTCAAAGTCAAAA
 CCATACTGG
 AATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAAAATAGCACCTGGGTAAAGGACACAACCTTCAGTGATATTAA
 CCGGCAATT
 CATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAATAGCATAAGAATTGGTTCCAAAGG
 AGACGTTTTT
 GTCATAAGAGAGCCCTTTATTTTCATGTTCTCACTTGAATGCAGGACCTTTTTTCTGACCCAAGGTGCCTT
 ACTGAATGA
 CAAGCATTCAAGTGGGACTGTAAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCTTAATGAGCTGCCCTGTCGGTGA
 AGCTCCGTCCC
 CGTACAATTCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTCATGATGGCATGGGCTGGCTAAC
 AATCGGAATT
 TCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTAAATACAACGGCATAATAACTGAAACCATAAAAAAGTT
 GGAGGAAGAA
 AATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAAATGGTTCATGTTTTACTATAATGACTGATGGCC
 CGAGTGATG
 GGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACC
 TAATTCTCAC
 TATGAGGAATGTTCTGTTACCCTGATACCGGCAAAGTGATGTGTGTGTGCAGAGACAATTGGCATGGTT
 CGAACCGGCC
 ATGGGTGTCTTTTCGATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTTTTTCGGTGACAAC
 CCGCGTCCCG
 AAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGATGTTGATGGAGCAAACGGAGTAAAGGGATTTTCATATA
 GGTATGGTAAT
 GGTGTTTGGATAGGAAGGACCAAAAGTCACAGTTCAGACATGGGTTTGAGATGATTTGGGATCCTAATG
 GATGGACAGA
 GACTGATAGTAAGTTCTCTGTGAGGCAAGATGTTGTGGCAATGACTGATTGGTCAGGGTATAGCGGAAG
 TTTCGTTCAAC
 ATCCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTTGAATTAATCAGGGGACGACCTA
 AAGAAAAACA
 ATCTGGACTAGTGCGAGCAGCATTTCTTTTGTGGCGTGAATAGTGATACTGTAGATTGGTCTTGCCAG
 ACGGTGCTGA
 GTTGCCATTGAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACTCCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO:8)

- 5 El virus A/PR/8/34 (H1N1, PR8(UW)) de alto título crece 10 veces mejor que otras cepas de PR8 A/PR/8/34 en huevos (10¹⁰ EID₅₀/mL; título de HA : 1:8.000). Por lo tanto, el reemplazo de los genes de HA y NA de PR8(UW) por los de una cepa del virus de la influenza que circula actualmente da como resultado una cepa de vacuna que se puede producir de manera segura y valida el uso de PR8(UW) como cepa de vacuna maestra.

- 10 Se determinaron los genes que contribuyen a diferentes propiedades de crecimiento entre PR8(UW) y PR8 (Cambridge), que proporciona los genes que no son de HA y NA de la cepa de vacuna NIBRG-14 (Figura 1). Se obtuvieron títulos más altos en huevos cuando la mayoría de los genes internos eran de PR8(UW). Los títulos más altos fueron con el segmento del gen M de PR8(UW) y el gen NS de PR8 (Cambridge). El gen NS en PR8 (UW) tiene una K (lisina) en el residuo 55 mientras que el gen NS en PR8(Cam) tiene una E (ácido glutámico). La subunidad de polimerasa (PA, PB1 y PB2) y los genes de NP de PR8(UW) mejoraron el crecimiento de un virus semilla de la vacuna
- 15 H5N1 en huevos embrionados de pollo, y el gen NS de PR8(Cambridge) mejoró el crecimiento de un virus de semilla de la vacuna H5N1 en huevos embrionados de pollo. Una tirosina (Y) en la posición 360 en PB2 de PR8(UW) probablemente contribuye a la alta tasa de crecimiento de ese virus en las células MDCK.

20 Ejemplo 2

- 20 Para establecer sistemas robustos para la producción de vacunas contra la influenza, se necesitan sistemas basados en cultivos celulares sin huevos. Las células Vero están aprobadas para uso humano y, por lo tanto, son huéspedes candidatos para la producción de vacunas contra el virus de la influenza. Para dilucidar la base molecular para el crecimiento eficiente del virus semilla de la vacuna contra la influenza en células Vero, se pasó el virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8) a través de células Vero 12 veces y se determinó el título de infectividad del virus resultante. El PR8
- 25 adaptado a células Vero tuvo un aumento de más de 4 log en los títulos de infectividad en relación con el PR8 adaptado a células no Vero (Figura 2).

- 30 Para determinar la base molecular de esa diferencia de crecimiento, se secuenciaron los genomas de ambos aislados. Se encontraron tres diferencias de aminoácidos: una en HA2, una en NA y una en PB2 (Figura 3). Para identificar la contribución de cada sustitución individual y de una combinación de dos de las sustituciones, se prepararon virus recombinantes con la sustitución o sustituciones individuales y se comparó el crecimiento de esos virus recombinantes con PR8 adaptado a células Vero y PR8 adaptado a células no Vero (Figura 4). Los resultados indicaron que la sustitución en HA2 era la principal responsable del crecimiento mejorado en las células Vero. La sustitución en HA2 (N117D) no potenció el crecimiento en células MDCK (Figura 5).
- 35

Debido a que HA2 tiene un dominio de fusión que se expone después de la infección, se empleó un ensayo de fusión para comparar las propiedades de HA2 de PR8 de tipo silvestre y N117D de HA2 (Figuras 7-8). El mutante N117D de HA2 fusionó células Vero a un pH más alto que PR8 de tipo silvestre. El pH endosómico en células Vero y células MDCK se determinó utilizando colorantes sensibles e insensibles al pH (Figuras 9-10). Los endosomas de las células Vero probablemente tengan un pH más alto que los de las células MDCK. Por lo tanto, la mutación N117D de HA2 puede elevar el pH óptimo para la fusión de membranas mediada por HA2, mejorando así la eficacia de replicación del virus en las células Vero.

Para determinar si la mutación N117D de HA2 sola podría mejorar la eficiencia de replicación del virus en diferentes virus en células Vero, esa sustitución se introdujo en dos virus H1N1 diferentes (una mutación de AAT por GAT) y un virus H3N2 (una mutación de AAC por GAC) en un ambiente de PR8 (seis segmentos de genes eran de PR8 adaptado a células Vero; PA, PB1, PB2, M, NS y NP) (Figura 11). La mutación N117D de HA2 mejoró la eficiencia de replicación de los tres virus probados en células Vero. Se puede emplear una estrategia de este tipo para preparar virus para vacuna con replicación mejorada en células Vero.

Referencias

- Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Tercera edición, ADIS Press, Ltd., Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1987).
- Aymard-Henry et al., *Virology: A Practical Approach*, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150 (1985).
- Bachmeyer, *Intervirology*, 5: 260 (1975).
- Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16a edición, Merck & Co., Rahway, NJ (1992).
- Hatta et al., *Science*, 293: 1840 (2001).
- Horimoto et al., *J. Virol.*, 68: 3120 (1994).
- Horimoto et al., *Vaccine*, 24: 3669 (2006).
- Keitel et al., en *Textbook of Influenza*, eds. Nickolson, K. G., Webster, R. G., y Hay, A. (Blackwell, Oxford), páginas 373-390 (1998).
- Laver & Webster, *Virology*, 69: 511 (1976).
- Neumann et al., *Adv. Virus Res.*, 53: 265 (1999).
- Neumann et al., *J. Gen. Virol.*, 83: 2635 (2002).
- Neumann et al., *J. Virol.*, 71: 9690 (1997).
- Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9345 (1999).
- Neumann et al., *Virology*, 287: 243 (2001).
- Osol (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).
- Sugawara et al., *Biologicals*, 30: 303 (2002).
- Webby & Webster et al., *Science*, 302: 1519 (2003).
- Wood & Robertson, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 842 (2004).
- Organización Mundial de la Salud TSR No. 673 (1982).
- Organización Mundial de la Salud. Casos humanos confirmados de influenza A aviar (H5N1).
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/index.html

REIVINDICACIONES

1. Una célula Vero infectada con un virus de la influenza recombinante aislado reordenado que comprende un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.
2. La célula Vero de la reivindicación 1, en la que el virus de la influenza recombinante aislado, reordenado tiene segmentos de genes de PA, PB1, PB2, NP, NS y M de un primer aislado de virus para vacuna de influenza y segmentos de genes heterólogos de HA y NA del virus de la influenza.
3. La célula Vero de la reivindicación 2, en la que el segmento del gen NA y el segmento del gen HA son del mismo aislado del virus de la influenza.
4. La célula Vero de la reivindicación 2 o 3, en la que los segmentos de los genes de PA, PB1, PB2, NP, NS y M en el virus de la influenza comprenden secuencias para al menos uno de los siguientes:
 - (a) un PB1, PB2, PA, NP, M o NS que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por las SEQ ID NOs: 1-6;
 - (b) un PA, PB1, PB2, NP, M o NS con al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el PA, PB1, PB2, NP, M o NS codificados por las SEQ ID NOs: 1-6;
 - (c) un PB1, PB2, PA, NP, M o NS que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por las SEQ ID NOs: 10-15; o
 - (d) un PA, PB1, PB2, NP, M o NS con al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el PA, PB1, PB2, NP, M o NS codificados por las SEQ ID NOs: 10-15.
5. La célula Vero de la reivindicación 2, en la que el segmento del gen NA en el virus de la influenza codifica una tirosina en la posición correspondiente a la posición 255 en NA N1.
6. Un virus de la influenza aislado que comprende un segmento del gen HA que codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, y que comprende un segmento del gen NA que codifica una proteína NA que tiene una tirosina en la posición correspondiente a la posición 255 en NA N1.
7. Una vacuna que tiene el virus aislado definido en la reivindicación 6.
8. Un método para preparar el virus de la influenza, que comprende poner en contacto una célula cultivada con:
 - uno o más vectores para la producción de ARNv del ARNv de PB1, ARNv de PB2, ARNv de PA, ARNv de HA, ARNv de NP, ARNv de NA, ARNv de M y ARNv de NS, comprendiendo dicho uno o más vectores un promotor operativamente unido, respectivamente, al ADN de PA, PB1, PB2, HA, NP, NA, M o NS del virus de la influenza unido a una secuencia de terminación de transcripción, en la que los ADN de PB1, PB2, PA, NP, NS y M en los vectores para la producción del ARNv son de uno o más aislados del virus para vacuna contra la influenza, en los que el ARNv de NA tiene secuencias para una NA heteróloga, y en la que el ARNv de HA codifica un ácido aspártico o ácido glutámico en lugar de asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3; y
 - uno o más vectores para la producción de ARNm de PA, PB1, PB2 y NP del virus de la influenza, comprendiendo dicho uno o más vectores un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica PA, PB1, PB2 o NP del virus de la influenza, y opcionalmente uno o más vectores para la producción de ARNm de HA, NA, M1, M2 o NS2 del virus de la influenza, comprendiendo dicho uno o más vectores un promotor operativamente unido a un segmento de ADN que codifica HA, NA, M1, M2 o NS2 del virus de la influenza;
 - en una cantidad eficaz para producir el virus infeccioso de la influenza.
9. Un método para preparar un virus de influenza recombinante con un segmento del gen HA que tiene un HA2 mutante, que comprende: alterar el ácido nucleico de HA del virus de la influenza para cambiar la asparagina, alanina, arginina o lisina en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3, por ácido aspártico o ácido glutámico; y expresar el ácido nucleico alterado en una célula que tiene vectores para la producción de ARNv de influenza y producción de proteína viral en una cantidad eficaz para producir virus de influenza recombinante con un segmento del gen HA que tiene el ácido aspártico o ácido glutámico en la posición correspondiente a la posición 117 en HA2 H1, o correspondiente a la posición 116 en HA2 H3.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que la célula es una célula de ave o una célula de mamífero.
11. El método de la reivindicación 8 o 10, en el que los ADN de PB1, PB2, PA, NP, NS y M en los vectores para producciones de ARNv tienen una secuencia que corresponde a una que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido correspondiente codificado por las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-15.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8, 10 u 11, en el que NA es N1.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que comprende además aislar el virus.
14. El método de la reivindicación 13, que comprende además infectar una célula Vero con el virus aislado.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la célula es una célula Vero, una célula 293T o una célula CHO.

PR8 (Cambridge)

PB2

AGCGAAAGCAGGTCAATTATATTCATATGGAAGAATAAAGAACTAAGAAATCTAATGTCGAGTCTCGCACCCGCGAGATA
 CTCACAAAAACCCGTGGACCATATGGCCATAATCAAGAGTACACATCAGGAAGACAGGAGAAGAACCCAGCACCTTAGGATG
 AAATGGATGATGGCAATGAAATATCCAATTACAGCAGACAAGAGGATAACGGAAATGATTCCTGAGAGAAATGAGCAAGGACAA
 ACTTTATGGAGTAAATGAATGATGCCGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACCTCTGGCTGTGACATGGTGGAAATAGGAATGGA
 CCAATGACAAATACAGTTTATTATCCAAAAATCTACAAAATTTATTTGAAAGAGTCTGAAAGGCTAAAGCATGGAACCTTTGGC
 CCTGTCCATTTTAAAAACCAAGTCAAAATACGTCCGAGAGTTGACATAAATCCTGGTCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCA
 CAGGATGTAATCATGGGAAGTTGTTTTCCCTAACGAAGTGGGAGCCAGGATACCTAACATCGGAATCGCAACTAACGATAACCAAA
 GAGAAGAAAGAAAGAACTCCAGGATTGCAAAATTTCTCCTTTGATGGTTGCATACATGTTGGAGAGAGAAGTGGTCCGCAAAACG
 AGATTCCTCCAGTGGCTGGTGGAAACAAGCAGTGTGTACATTGAAGTGTTCATTTGACTCAAGGAACATGCTGGGAACAGATG
 TATACTCCAGGAGGGGAAGTGAAGAATGATGATGTTGATCAAAAGCTTGATTATTGCTGCTAGGAACATAGTGAGAAGAGCTGCA
 GTATCAGCAGACCCACTAGCATCTTTATTGGAGATGTGCCACAGCACAGATTGGTGGAAATAGGATGGTAGACATCCTTAAG
 CAGAACCCCAACAGAAAGAGCAAGCCGTGGATATATGCAAGGCTGCAATGGGACTGAGAATTAGCTCATCTTCAGTCTTTGGTGGG
 TTCACATTTAAGAGAACAAGCGGATCATCAGTCAAGAGAGAGGAAGAGGTGCTTACGGGCAATCTTCAAAACATTTGAAGATAAGA
 GTGCATGAGGGATCTGAAGAGTTTCAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCCATACTCAGAAAAGCAACAGGAGATTGATTGAG
 CTGATAGTGAGTGGGAGAGACGAACAGTTCGATTGCCGAAGCAATAATTGTGGCCATGGTATTTTCAAGAGGATTGTATGATA
 AAAGCAGTTAGAGGTGATCTGAATTTCTGCAATAGGGCGAATCAGCGACTGAATCCTATGCATCAACTTTTAAAGACATTTTCAG
 AAGGATGCGAAAGTGCTTTTCAAAATTTGGGAGTTTGAACCTATGCACAATGTGATGGGAATGATTGGGATATTGCCGACATG
 ACTCCAAGCATCGAGATGTCAATGAGAGGAGTGAAGTACAGCAAAATGGGTGTAGATGAGTACTCCAGCAGCGAGAGGGTAGTG
 GTGAGCATTGACCGGTTCTTGAGAGTCAAGGACCAACAGGAGAAATGTACTACTGTCTCCGAGGAGGTGAGTGAACACAGGGA
 ACAGAGAAACTGACAAATACTTACTCATCTCAATGATGTGGGAGATTAAATGGTCTGAAATCAGTGTGGTCAATACCTATCAA
 TGGATCATCAGAACTGGGAACTGTTAAATTCAGTGGTCCCAGAACCTTACAATGCTATACAATAAAATGGAAATTTGAACCA
 TTTTCACTCTTTAGTACCTAAGGCCATTAGAGGCCAATACAGTGGGTTTGTAAAGAACTCTGTTCCAACAAATGAGGGATGTGCTT
 GGGACATTTGATACCGCACAGATAATAAAATCTTCTCCCTCGCAGCGCTCCACCAAGCAAAAGTAGAATGCAGTTCTCTCA
 TTTACTGTGAATGTGAGGGGATCAGGAATGAGAATACTTGTAAAGGGGCAATTTCTCTGTATTCACTACAACCAAGGCCACGAAG
 AGACTCAGAGTTCTCGGAAAGGATGCTGGCACTTTAACCGAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTGGAGTGGAGTCCGCTGTTCTG
 AGGGGATTCCTCATTCTGGGCAAGAAAGACAGGAGATATGGGCCAGCATTAAGCATCAATGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
 GAGAAGGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGAGACGTGGTGTGTAATGAAACGAAACGGGACTTACGATCTTACTGACAGC
 CAGACAGCGACCAAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGTGAATAGTTTAAAAACGACCTTGTCTTACT

SEQ ID NO:11

PB1

AGCGAAAGCAGGCAAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACCTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAGCACAAAATGCTATAAGCACA
 ACTTTCCCTTATACCGGAGACCTTCTTACAGCCATGGGACAGGAACAGGATACACCATGGATCTGTCAACAGGACACATCAG
 TACTCAGAAAAGGGAAGATGGACAACAAACACCGAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGGCACTGCCAGAAGAC
 AATGAACCAAGTGTTATGCCCAACAGATTGTGATTGGAAGCAATGGCTTTCTTGAGGAATCCCATCCTGGTATTTTGA
 AACTCGTGTATTGAAACGATGGAGTTGTTGAGCAAAACAGAGTAGACAAGCTGACACAAGGCCGACAGACCTATGACTGGACT
 TTAATAGAAACCAAGCCTGCTGCAACAGCATTGGCCAACACAATAGAAGTGTTCAGATCAAATGGCCTCACGGCCAATGAGTCA
 GGAAGGCTCATAGACTTCTTAAGGATGTAATGGAGTCAATGAAAAAAGAAAGAAATGGGGATCACAACCTCATTTTCAAGAAAAAG
 AGACGGGTGAGAGACAATATGACTAAGAAAAATGATAACACAGAGAACAATAGGTAAAAGGAAACAGAGATTGACAAAAAGGGGT
 TATCTAATTAGAGCATTGACCTGAACACAATGACCAAGATGCTGAGAGAGGGAAGCTAAAACGGAGAGCAATTGCAACCCCA
 GGGATGCAAAATAGGGGGTTTGTACTTTGTTGAGACACTGGCAAGGAGTATATGTGAGAACTTGAACAAATCAGGGTTGCCA
 GTTGGAGGCAATGAGAAGAAAGCAAAGTTGGCAAATGTTGTAAGGAAGATGATGACCAATTCTCAGGACACCGAACTTTCTTTC
 ACCATCACTGGAGATAACCAAAATGGAACGAAAAATCAGATCTCTGGATGTTTTTGGCCATGATCACATATATGACCAGAAAT
 CAGCCCGAATGGTTCAGAAATGTTCTAAGTATTGCTCCAATAATGTTCTCAAAACAAAATGGCGAGACTGGGAAAAGGGTATATG
 TTTGAGAGCAAGAGTATGAACTTAGAACTCAAAATACCTGCAGAAATGCTAGCAAGCATTGATTTGAAATATTTCAATGATTCA
 ACAAGAAAGAAGATTGAAAAAATCCGACCGCTCTTAATAGAGGGGACTGCATCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTT
 AATATGTTAAGCACTGTATTAGGCGTCTCCATCCTGAATCTTGGACAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGT
 CTTCAATCCTCTGACGATTTGCTCTGATTGTGAATGCACCAATCATGAAGGGATTCAAGCCGGAGTCGACAGGTTTTATCGA
 ACCTGTAAGCTACTTGGAAATCAATATGAGCAAGAAAAAGTCTTACATAAACAGAACAGGTACATTTGAATTCACAAGTTTTTCT
 TATCGTTATGGGTTTGTGCAATTTGAGCATGGAGCTTCCAGTTTTGGGGTGTCTGGGATCAACGAGTCAGCGGACATGAGT
 ATTGGAGTTACTGTCAAAAAACAATATGATAAAACAATGATCTTGGTCCAGCAACAGCTCAAATGGCCCTTCAGTTGTTCTATC
 AAAGATTACAGGTACACGTACCGATGCCATAGAGGTGACACACAAATACAAACCCGAAGATCATTTGAAATAAAGAACTGTGG
 GAGCAAAACCGTTCCAAAGCTGGACTGCTGGTCTCCGACGAGGCCCCAAATTTATACAACATTAGAAATCTCCACATTTCTGAA
 GTCTGCTTAAATGGGAATTTGATGGATGAGGATTACAGGGGCTTTATGCAACCCACTGAACCAATTTGTGAGCCATAAAGAA
 ATTGAATCAATGAACAAATGCAGTGATGTCAGCAGCATGGTCCAGCCAAAAACATGGAGTATGATGCTGTTGCAACAAACACAC
 TCCTGGATCCCCAAAAGAAATCGATCCATCTTGAATCAAGTCAAGAGAGGAGTACTTGAAGATGAACAAATGTACCAAGGTGC
 TGCAATTTATTTGAAAAATTTCTTCCAGCAGTTTATACAGAAGACAGTCCGGATATCCAGTATGGTGGAGGCTATGGTTCC
 AGAGCCCGAATTTGATGCACGGATTGATTTGCAATCTGGAAGGATAAAGAAAGAGAGTTCACTGAGATCATGAAGATCTGTTCC
 ACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTTCATGAAAAATGCCTTGTCTTACT

SEQ ID NO:10

Fig. 1A

PR8 (Cambridge)

GTCTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGC
TATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAATGGTGCAAGCGAT
GAGAACCATTTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAAAAATTTGCAGGCCTATCAGAAACGAAT
GGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATCCTCTCGCTATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTC
TTGATCGTCTTTTTTCAAATGCATTTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGT
CTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTGAGCATAGAGCTGGAGTAAA
AAACTACCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO:14

NS

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTAGGTTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCA
AACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCA
GCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGG
CACTTAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCA
TGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTATCAGAAATGGACCAGGCGATCATGGATAAAAAACATCATACTGAAAG
CGAACTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAA
TTTCACCATTTGCCTTCTCTCCAGGACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGA
ATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAAATGGGAGACCTCCACTCACTC
CAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTGAGAGTTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAAA
CTGAAGGTAACAGAGAAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGA
ACTTTCTCATTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT

SEQ ID NO:15

Fig. 1C

PROPIEDADES DE CRECIMIENTO DEL VIRUS PR8 ADAPTADO A VERO (PR8-VERO) EN CÉLULAS VERO

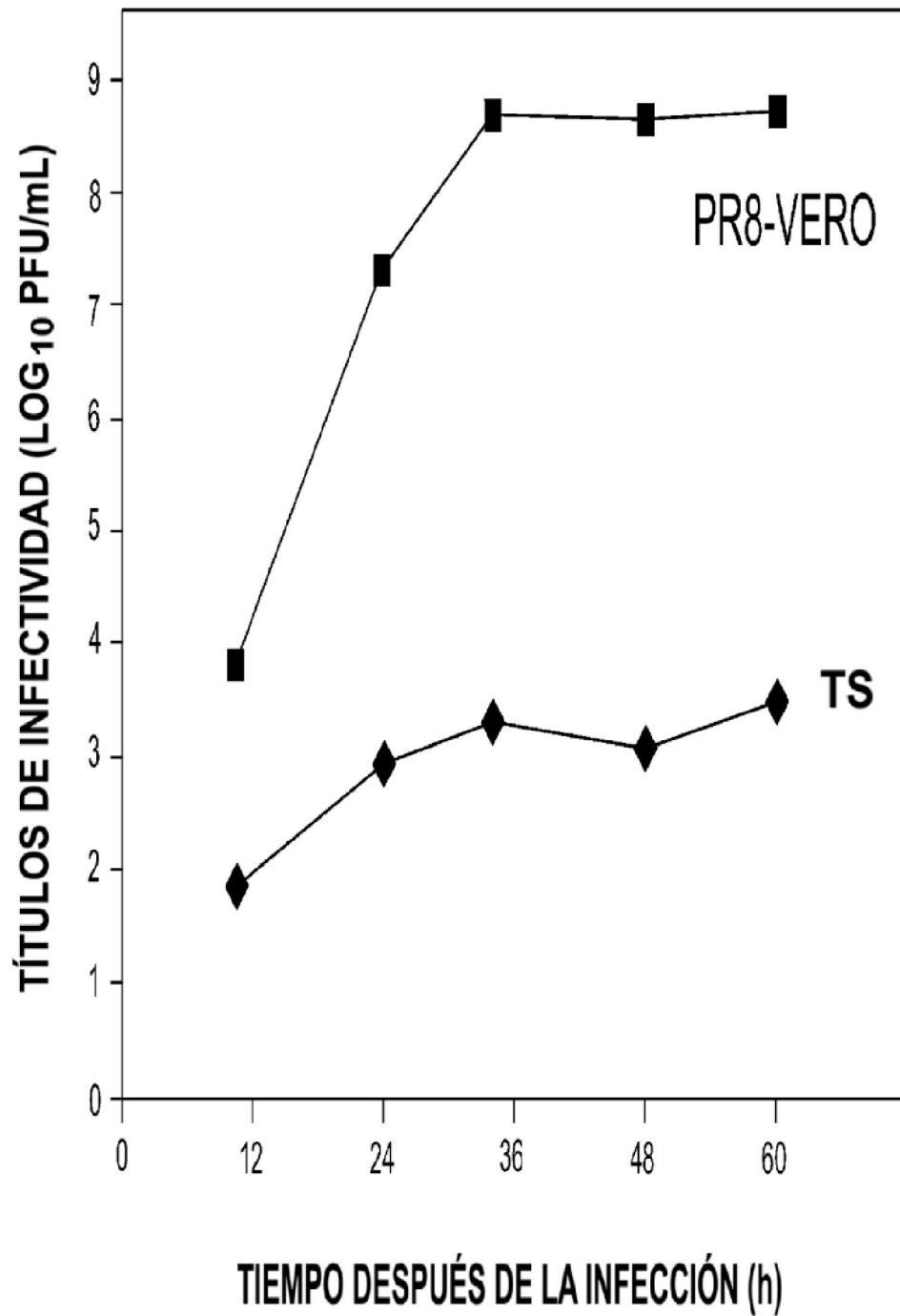


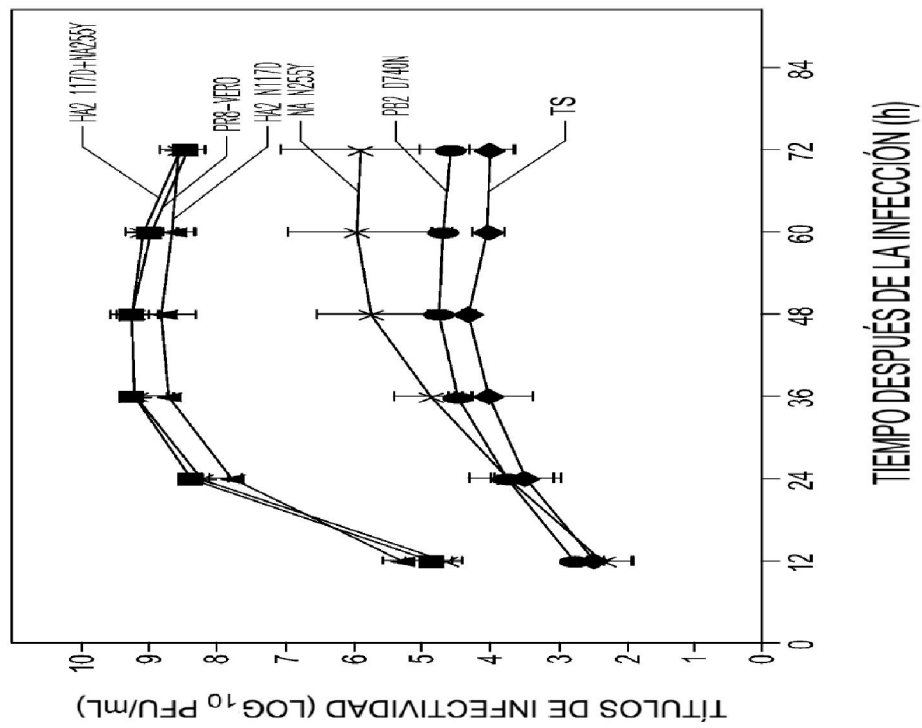
Fig. 2

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS
ENTRE TS Y PR8-VERO

	POSICIÓN	TS	PR8-VERO
HA2	117	N	D
NA	255	N	Y
PB2	740	D	N(2/4)

Fig. 3

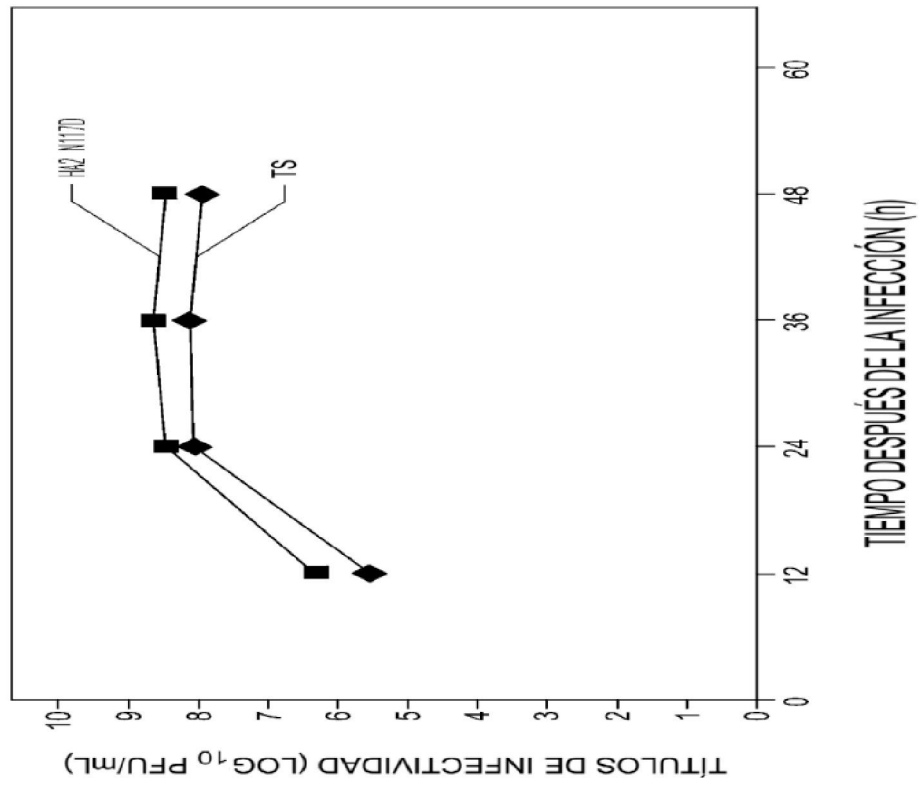
PROPIEDADES DE CRECIMIENTO PARA MUTANTES DE PR8 EN CÉLULAS VERO



LA MUTACIÓN N170 DE HA2 ERA PRINCIPALMENTE RESPONSABLE POR
LAS PROPIEDADES DE ALTO CRECIMIENTO EN CÉLULAS VERO

Fig. 4

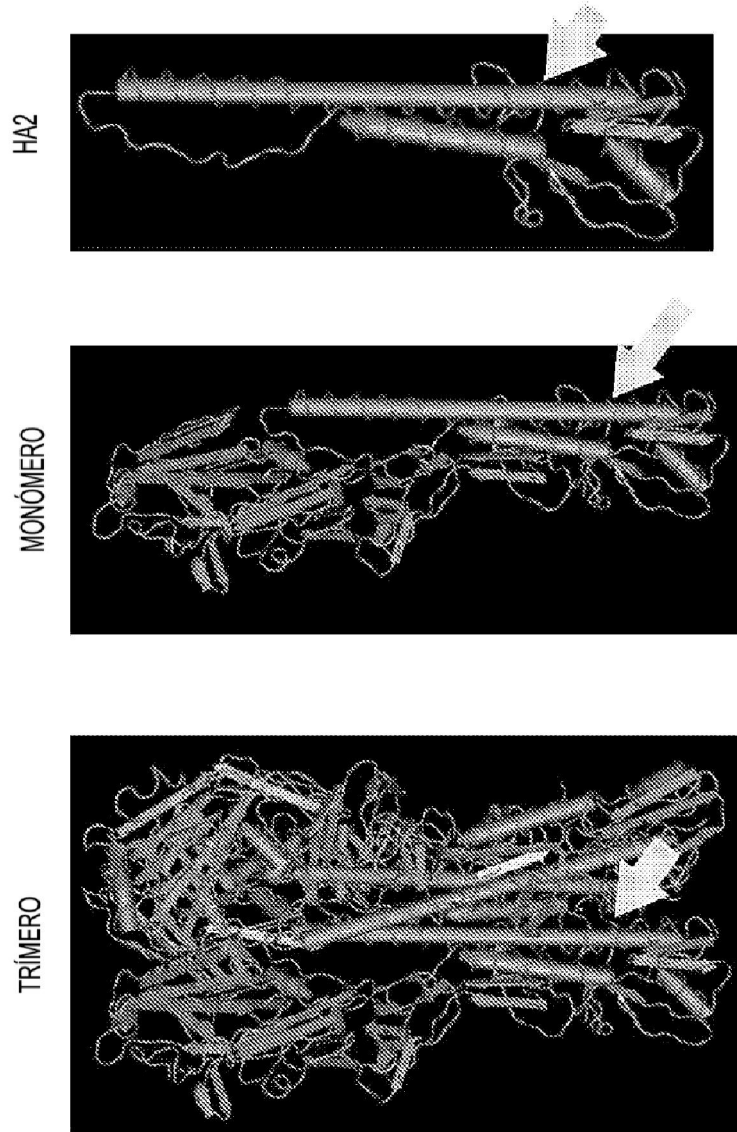
PROPIEDADES DE CRECIMIENTO DEL MUTANTE N117D DE HA2 EN CÉLULAS MDCK



LA EFICIENCIA DE REPLICACIÓN FUE COMPARABLE ENTRE EL TS
Y EL MUTANTE

Fig. 5

POSICIÓN DE 117 DE H2A EN LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE HA



HEMAGLUTININA H1 HUMANA 1934 (ID DE MMDB: 26941, ID DE PDB: 1RU7)

Fig. 6

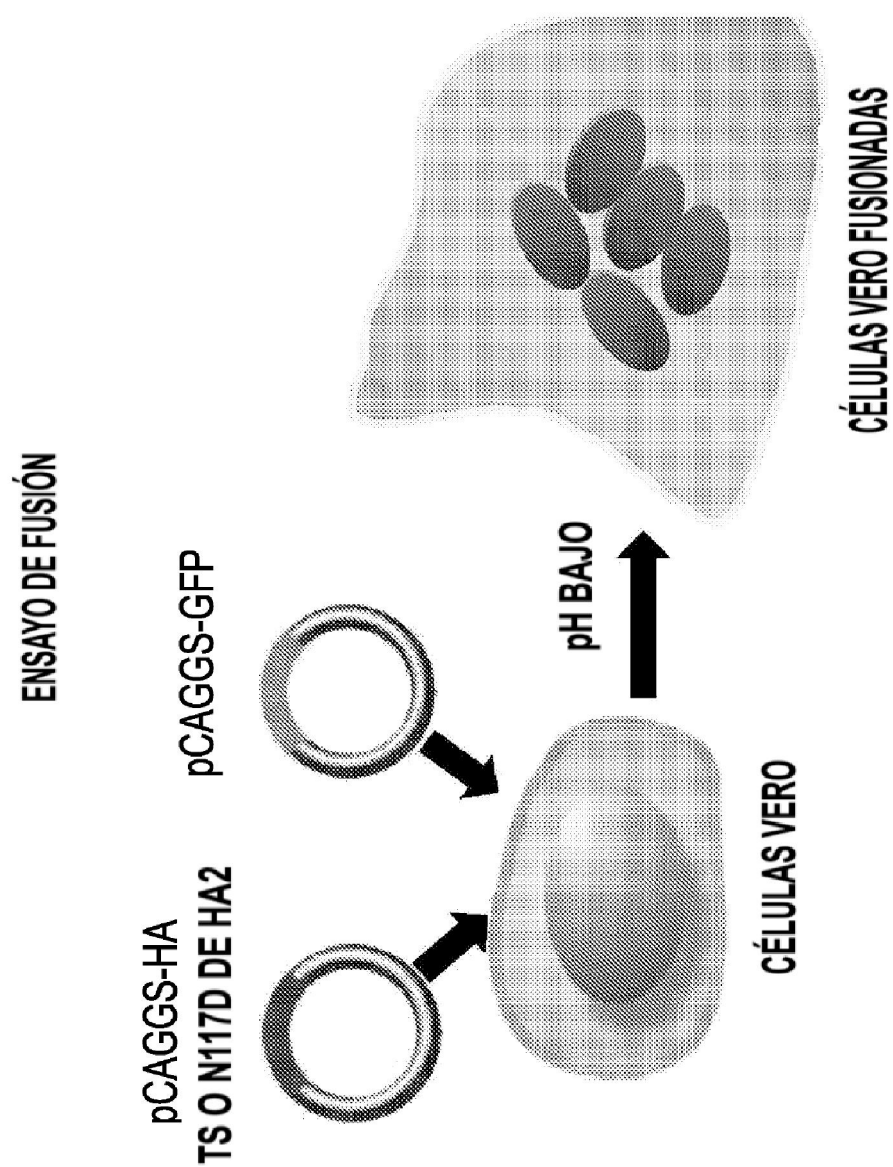
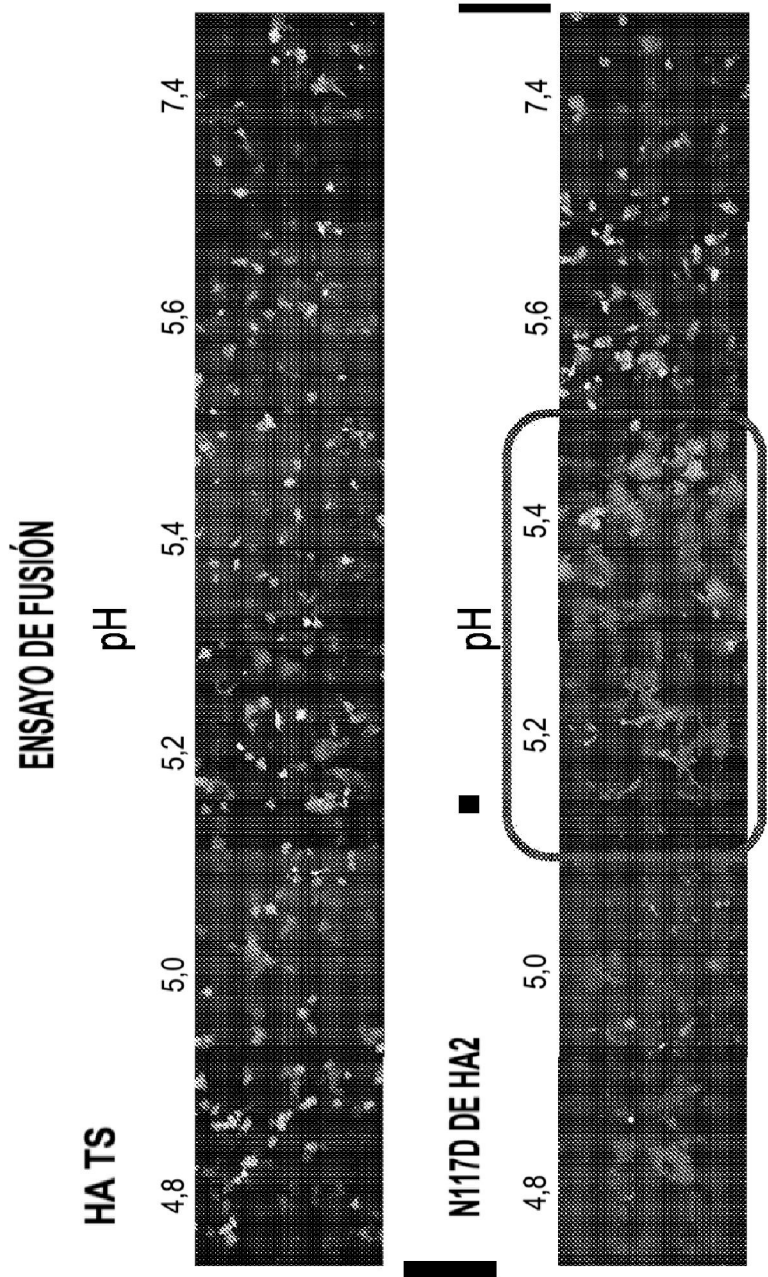


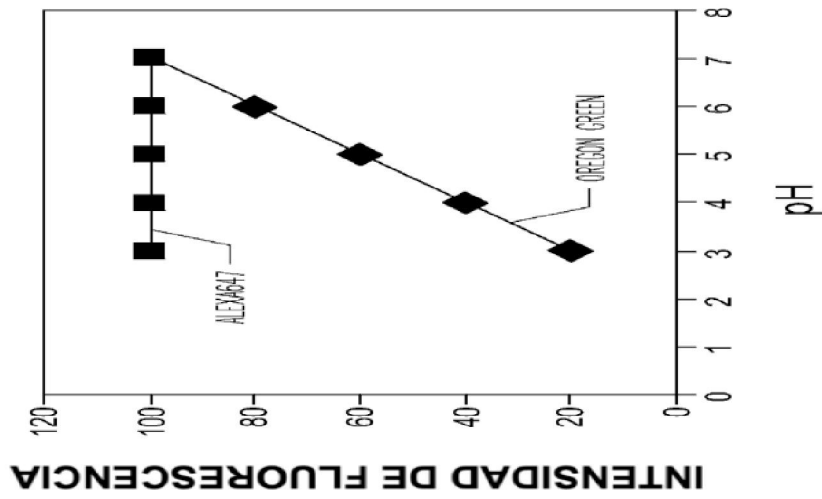
Fig. 7



EL MUTANTE N117D DE HA2 FUSIONADO A LAS CÉLULAS A UN PH MÁS ALTO QUE LAS DE TS.

Fig. 8

LO PRINCIPAL DEL MÉTODO DE COMPARACIÓN DE pH ENDOSOMAL ENTRE DOS DIFERENTES CÉLULAS (CÉLULAS MDCK FRENTA A VERO)



LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE OREGON GREEN ES SENSIBLE AL pH BAJO
AUNQUE LA INTENSIDAD DE ALEXA488 NO ES SENSIBLE AL VALOR DEL PH

EL PH PUEDE COMPARARSE MIDRIENDO LA INTENSIDAD Y CALCULANDO LA RELACIÓN ENTRE ALEXA488 Y OREGON GREEN

Fig. 9A

EL MÉTODO DE COMPARACIÓN DE pH ENDOSÓMICO ENTRE CÉLULAS MDCK Y CÉLULAS VERO

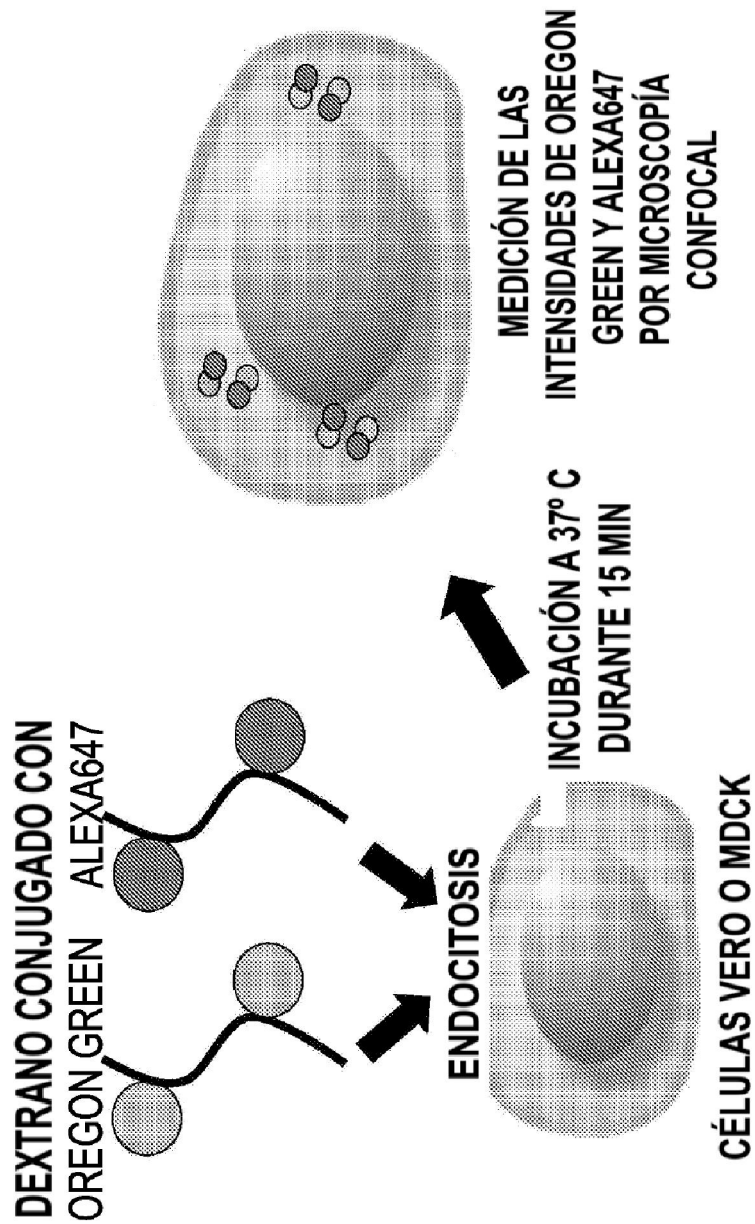


Fig. 9B

COMPARACIÓN DE pH ENDOSÓMICO
ENTRE CÉLULAS MDCK Y CÉLULAS VERO

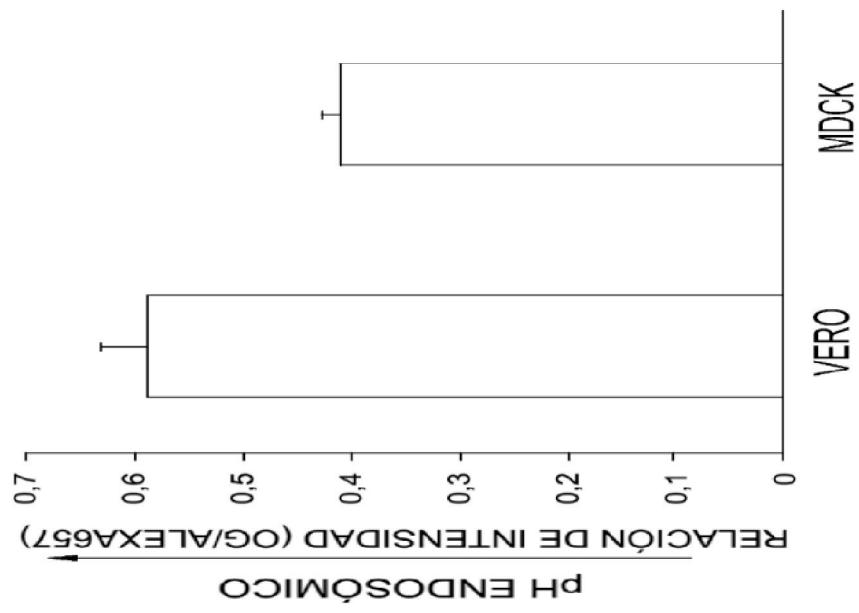


Fig. 10

LA MUTACIÓN N117D DE HA2 MEJORA LA EFICIENCIA DE REPLICACIÓN DEL
REORDENAMIENTO 6:2 DE A/KAWASAKI/173/2001 (H1N1) CON UN DONANTE
DE PR8 EN CÉLULAS VERO

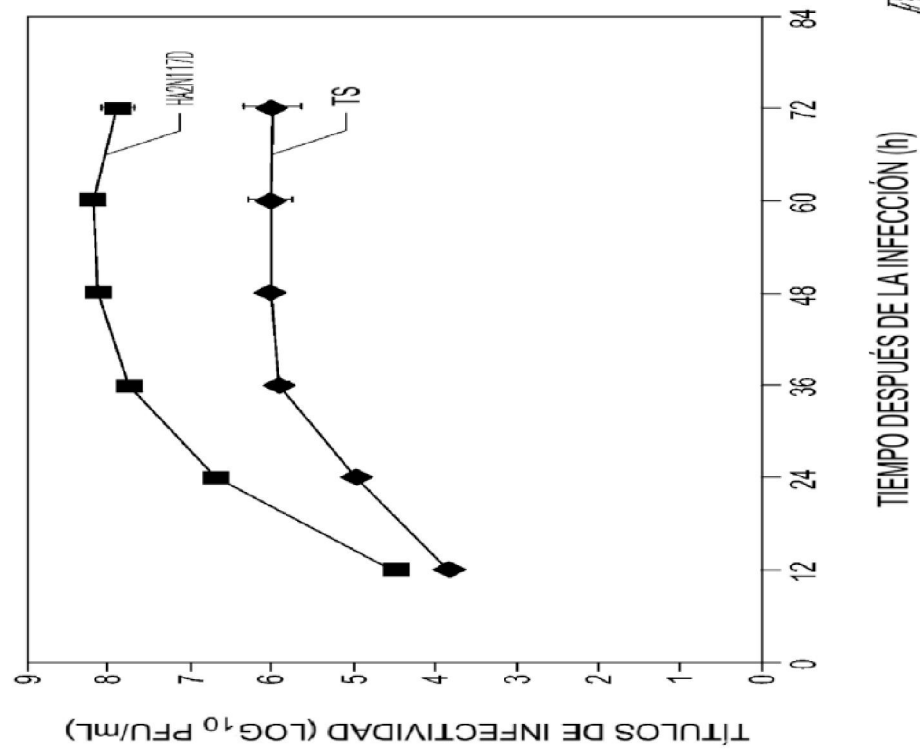


Fig. 11A

LA MUTACIÓN N117D DE HA2 MEJORA LA EFICIENCIA DE REPLICACIÓN DEL
REORDENAMIENTO 6:2 DE A/KAWASAKI/UTK-4/2009 (H1N1) CON UN DONANTE
DE PR8 EN CÉLULAS VERO

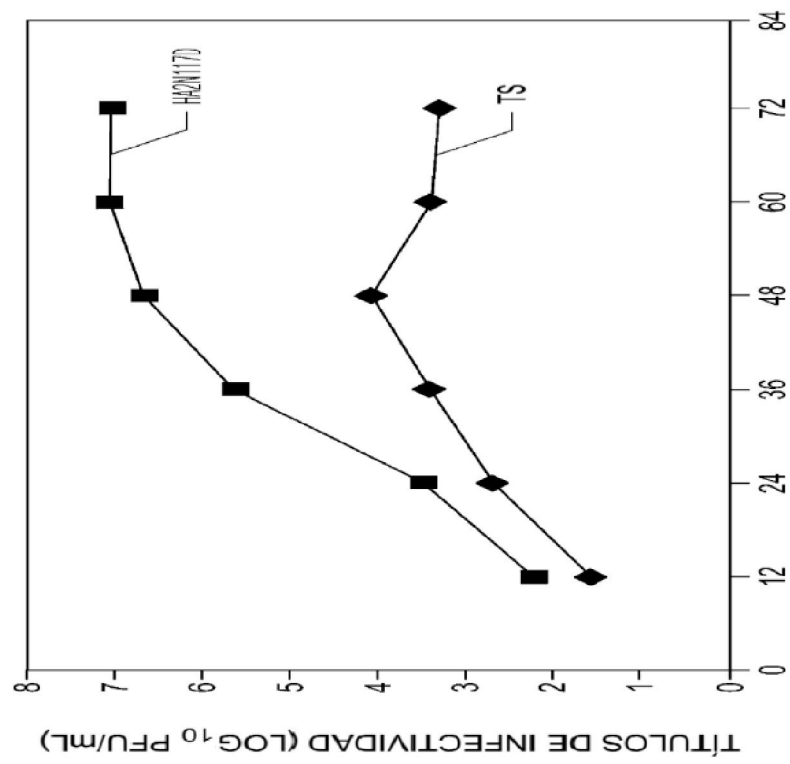


Fig. 11B

LA MUTACIÓN N117D DE HA2 MEJORA LA EFICIENCIA DE REPLICACIÓN DEL
REORDENAMIENTO 6:2 DE A/YOKOHAMA/2017/2003 (H3N2) CON UN DONANTE
DE PR8 EN CÉLULAS VERO

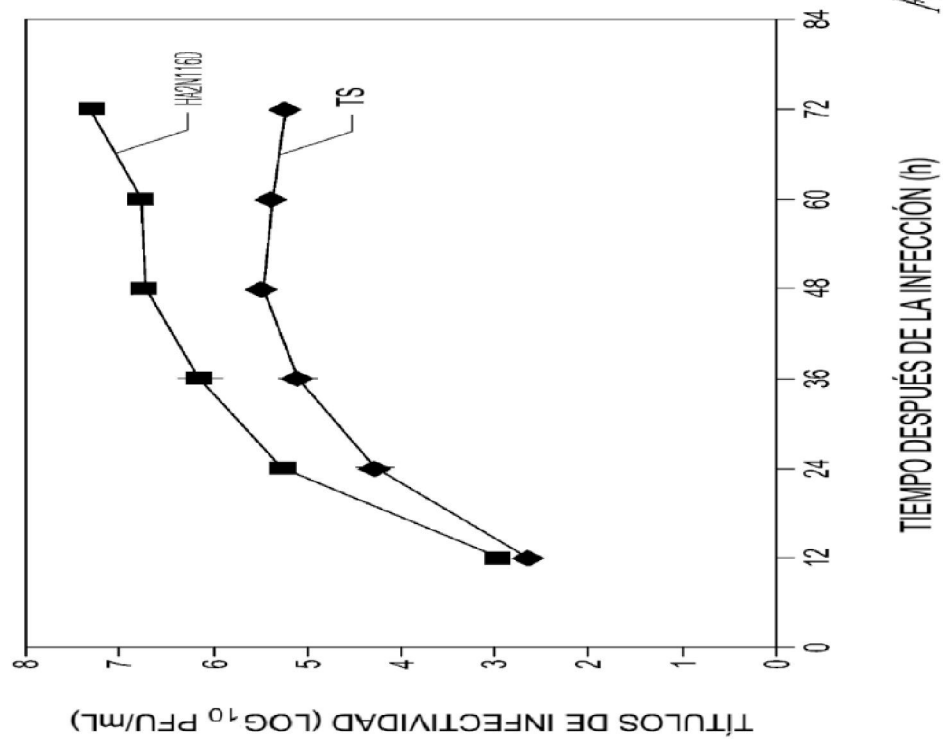


Fig. 11C

HA1	11	107
H3HU	ATLCLGHAVPNGTLVKTTITDDQIEVTNATELVQSSSTGKICN.NPHRIIDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQN.ETWDLFVERSKAFS.NCYPYDVDPDYAS	
H5AV	DQI I Y NNSTEQ D MEKN T H QDILEKTHN L DL GVKP ILR SVAGW N M E L VPE SYI KDNVPVNGL ENFN EE	
H5HU	DQI I Y NNSTEQ D MEKN T H QDILERTHN L DL GVKP ILR SVAGW N M E I VPE SYI KASPANDL GNFN EE	
H9SW	DKI I YQSTNSTET D L ETN P H K LHTEHN ML AT LGHP ILDT IEGLIY N S LLLGGRE SYI PS VNGM GN ENLEE	
H9HU	DKI I QSTNSTET D L ETN P H K LHTEHN ML ATSLGHP ILDT IEGLVY N S LLLGGRE SYI S VNGT GN ENLEE	
	108	203
H3HU	LRSLVASSGTLEFITEGF...TWGTQTQN.GGSNACKRPGSGFFSRINWLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLIYIWHHPSTNQEQTSLSLVQASGRVT	
H5AV	KH LS TNHF K RI.IPRSS SNHDASS V S PYNGR S RNVV I KNN A TIKRSYN TNQE L IL NDAA K QNPTTY S	
H5HU	KH LSRINHF K QI.IPKSS SNHDASS V S PYLGR S RNVV I KN A TIKRSYN TNQE L VL NDAA K QNPTTY S	
H9SW	FS ASSYQR QI. PDTI .N SYS. T K S....DS RSMR QKNN A QDAQYT RGKSI M N P DTV N TRDTTITS	
H9HU	T FS ASSYQR QI. PDT .N YT. T R S....GS RSMR QKSGF QDAQYT RGKSI P YT N RNDTITS	
	204	302
H3HU	VSTRRSQQTIIIPNIGSRPWVRGLSSRSISYIWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPR.GYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISECITPNGSIPNDKPFQNVNKITY	
H5AV	G STLN RS E AT K N Q G MEF L N AINFE F EYA KIVKK G A K GLEYGN NTK Q M A NSSM H HPL I	
H5HU	G STLN RL E AT K N Q G MEF L N AINFE F EYA KIVKK D T K ELEYGN NTK Q M A NSSM H HPL I	
H9SW	T EDINR FK V P L N HG DY S L QT R R R WY HILSGESHGR LKT LMSGN VQ Q ER GLNTTL H S YA	
H9HU	T EDLNR FK V P L N QG DY S L QT R R R WY HVLSGGSHGR LKT LKGGN VQ Q EK GLNSTL H S YA	
	303	328 *
H3HU	GACPKYVKQNTLKLATGMNRNVPEKQT.....R	SEQ ID NO:16
H5AV	E SGR V L QRE	SEQ ID NO:17
H5HU	E S R V L T QRERRRKK	SEQ ID NO:18
H9SW	N GVKS V L ARSS.....	SEQ ID NO:19
H9HU	T RV S V L ARSS.....	SEQ ID NO:20

Fig. 12A

HA2	1	100
H3HU	GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRYIEKTNKFKHQIEKEFESEVEGRIQDLEKXVEDTKIDLWSYNAELLV	
H5AV	G Q H S EQ S Y KE K GTTN V S D M TQ EA G NNL R EN N KM GFL V T	
H5HU	G Q H S EQ S Y KE K GTTN V S N M TQ EA GR NNL R EN N KM GFL V T	
H9SW	G P L A Q S DQ V M RD K K TS V N D M KQ GI DH T LNMINNK D QIQ I T	
H9HU	G P L A Q S DQ V M RD K K TS V N D M KQ EI DH T LNMINNK D QIQ V A	
	101	199
H3HU	ALENQHTIDLTDSMKNLFEKTRRQLRENAEEMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWI.SFAISCFLLC	
H5AV	LM ER L FH NVKN D V L D K L EF E M K YPQ SE RL EE S K E MGIYQ S Y TVA SLA A	
H5HU	LM ER L FH NVKN D V L D K L EF E M K YPQ SE RL EE S K E MGIYQ S Y TVA SLA A	
H9SW	L K L EH ANV N N VK A CS M D K EL DQ M T NRRK KE SKLE QK E K E EGTYK T Y TVA SLVIA	
H9HU	L K L EH ANV N N VK A CS M D K EL DQ M T NRRK E SRLE QK E -----	
	200	221
H3HU	VLLGFTIMWACQGRNIRCNICI	SEQ ID NO:23
H5AV	MIA LSL M SN SLQ R	SEQ ID NO:24
H5HU	MVA LSL M SN SLQ R	SEQ ID NO:25
H9SW	MGFAA LF MS-----	SEQ ID NO:26
H9HU	-----	SEQ ID NO:27

Fig. 12A CONTINUACIÓN

```

1  MKAILLVLLY  TFATANADTL  CIGYHANNST  DTVDTVLEKN  VTVTHSVNLL  EDKHNGKLCK
61  LRGVAPLHLG  KCNIAGWILG  NPECESLSTA  SWSYIVETP  SSDNGTCYPG  DFIDYEELRE
121 QLSSVSSFER  FEIFPKTSSW  PNHDSNKGVT  AACPHAGAKS  FYKNLIWLVK  KGNSYPKLSK
181 SYINDKGKEV  LVLWGIHHP  TSADQQSLYQ  NADAYVFVGS  SRYSKKFKPE  IAI RPKVRDQ
241 EGRMNYWTL  VEPGDKITFE  ATGNLVVPRY  AFAMERNAGS  GIIISDTPVH  DCNTTCQTPK
301 GAIN TSLPFQ  NIHPITIGKC  PKYVKSTKLR  LATGLRNIPS  IQSRGLFGAI  AGFIEGGWTG
361 MVDGWYGYHH  QNEQSGYAA  DLKSTQNAID  EITNKVNSVI  EKMNTQFTAV  GKEFNHLEKR
421 IENLNKKVDD  GFLDIWYNA  ELLVLENER  TLDYHDSNVK  NLYEKVRSQ L  KNNAKEIGNG
481 CFEFYHKCDN  TCMESVKNGT  YDYPKYSEEA  KLNREEIDGV  KLESTRIYQ I  LAIYSTVASS
541 LVLV VSLGAI  SFWMCSNGSL  QCRICI  SEQ ID NO:21

```

Fig. 12B

A/Kawasaki/173/2001 (H1N1)
 GLFGAIAFGIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVG
 KEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKDLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCF
 EFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLLVLSLGAISFWM
 CSNGSLQCRICI
 SEQ ID NO:28

A/Kawasaki/UTK-4/2009 (H1N1)
 GLFGAIAFGIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVG
 KEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKDLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFE
 FYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLLVLSLGAISFWMC
 SNGSLQCRICI
 SEQ ID NO:29

A/Yokohama/2017/2003 (H3N2)
 GIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEF
 SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMDKLFERTKKQLRENAEDMNGCFCFIYH
 KCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIWACQKGN
 IRCNICI
 SEQ ID NO:30

Fig. 13