



# Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-133991- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:06:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80

**SOLICITUD**

## **PATENTE DE INVENCION P C T**

**EXPEDIENTE No.** .

**TÍTULO** VACUNAS NOVEDOSAS CONTRA EL VIRUS DE LA  
INFLUENZA PANDÉMICA A/H1N1

**SOLICITANTE** HECTOR MANUEL ZEPEDA LOPEZ

**DOMICILIO** CRUZ DE VALLE VERDE No. 14 INT. 201, COL  
SANTA CRUZ DEL MONTE , CP. 53110 NAUCALPAN  
MEXICO

**APODERADO** CAROLINA VERA MATIZ

**BOGOTÁ, D.C.** Mayo 30 de 2013



VERA ABOGADOS ASOCIADOS S.A.

Calle 70 A No. 11 - 43 Teléfonos: (57-1) 312 7928 - 317 6650 Fax: (57-1) 212 6167 - 606 2872

Web: [www.veraabogadossa.com](http://www.veraabogadossa.com) E-mail: [vera@veraabogadossa.com](mailto:vera@veraabogadossa.com)



No. 13-133991- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:06:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
SOLICITUD FACE NACIONAL - PCT

|                                                                                                                                                                |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                                                              | TIPO DE SOLICITUD                                                                             | <input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención<br><input type="checkbox"/> Capítulo I       | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad<br><input type="checkbox"/> Capítulo II |
| 2                                                                                                                                                              | DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)                                                        |                                                                                                       |                                                                                                |
| Solicitud Internacional No. PCT/                                                                                                                               |                                                                                               | Fecha / /                                                                                             |                                                                                                |
| Publicación Internacional No. WO                                                                                                                               |                                                                                               | Fecha / /                                                                                             |                                                                                                |
| 3                                                                                                                                                              | TITULO DE LA INVENCION                                                                        |                                                                                                       |                                                                                                |
| VACUNAS NOVEDOSAS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA PANDEMICA A/H1N1                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 4                                                                                                                                                              | CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)                                                             |                                                                                                       |                                                                                                |
| 5                                                                                                                                                              | SOLICITANTE(s) <input checked="" type="checkbox"/> Esta persona también es inventor           |                                                                                                       |                                                                                                |
| HECTOR MANUEL ZEPEDA LOPEZ                                                                                                                                     |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| Documento de identificación: <input type="checkbox"/> C.C. <input type="checkbox"/> C.E. <input type="checkbox"/> NIT <input checked="" type="checkbox"/> Otro |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 6                                                                                                                                                              | DATOS DEL SOLICITANTE                                                                         |                                                                                                       |                                                                                                |
| Nacionalidad / País de Constitución<br>MEXICO                                                                                                                  |                                                                                               | Dirección del Titular<br>CRUZ DE VALLE VERDE No. 14 INT. 201, COL SANTA CRUZ DEL MONTE ,<br>CP. 53110 |                                                                                                |
|                                                                                                                                                                |                                                                                               | País MEXICO                                                                                           | Ciudad NAUCALPAN                                                                               |
| Correo electrónico<br>vera@veraabogadossa.com                                                                                                                  |                                                                                               | No. Fax<br>2126167                                                                                    | Número telefónico:<br>3127928                                                                  |
| 7                                                                                                                                                              | INVENTOR(es)                                                                                  |                                                                                                       |                                                                                                |
| 1. HECTOR MANUEL ZEPEDA LOPEZ                                                                                                                                  |                                                                                               | NOMBRE NACIONALIDAD<br>MEXICO                                                                         |                                                                                                |
| 2.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 3.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 4.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 8                                                                                                                                                              | DATOS INVENTOR(es)                                                                            |                                                                                                       |                                                                                                |
| 1. PAIS RESIDENCIA<br>MEXICO                                                                                                                                   |                                                                                               | CIUDAD DIRECCIÓN<br>NAUCALPAN                                                                         |                                                                                                |
| 2.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 3.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 4.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)                                                                                                              |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o inventores se indican en una hoja a continuación.                                                          |                                                                                               |                                                                                                       |                                                                                                |
| 9                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> REPRESENTANTE LEGAL <input checked="" type="checkbox"/> APODERADO    |                                                                                                       |                                                                                                |
| CAROLINA VERA MATIZ                                                                                                                                            |                                                                                               | No. Documento Identidad<br>52225999                                                                   | No. Tarjeta profesional<br>T.P. 91835 del C.S. de la                                           |
| Dirección para envío de correspondencia<br>Calle 70 A # 11 -43                                                                                                 |                                                                                               | Correo electrónico<br>cvera@veraabogadossa.com                                                        |                                                                                                |
| País Colombia                                                                                                                                                  |                                                                                               | No. Telefónico 3127936                                                                                |                                                                                                |
| Estado - Ciudad Bogotá D.C.                                                                                                                                    |                                                                                               | No. Fax 2126167                                                                                       |                                                                                                |
| 10                                                                                                                                                             | DECLARACIONES DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO |                                                                                                       |                                                                                                |
| (33) PAIS DE ORIGEN                                                                                                                                            |                                                                                               | CÓDIGO PAIS                                                                                           | (31) NUMERO                                                                                    |
| 1.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       | (32) FECHA DD/MM/AAAA<br>/ /                                                                   |
| 2.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       | / /                                                                                            |
| 3.                                                                                                                                                             |                                                                                               |                                                                                                       | / /                                                                                            |

2

11

DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI

☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, expedido por la Autoridad competente.

12

DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI

☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o numero de registro.

13

REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI

☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas

☐

Universidades públicas o privadas

☐

Entidades sin ánimo de lucro

☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos.

14

AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA

☐ SI

☒ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15

COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO

No.

Fecha / /

16

FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

17

ANEXOS

Documentación Técnica

1.

☒ Descripción

N° de folios: 0

2.

☒ Reivindicaciones

N° Reivindicaciones: 0

3.

☒ Dibujos y/o figuras

N° folios: 0

4.

☒ Resumen

5.

☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso

6.

☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.

7.

☐ Arte final 12 x 12

8.

☐ Anexo formato digital

Documentación Jurídica

9.

☐ Poderes, si fuera el caso

10.

☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del invento al solicitante o a su causante

11.

☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, si fuera el caso.

12.

☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos tradicionales, o certificado o numero de registro, si fuera el caso.

13.

Reducción de tasas

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.

☐ Hoja de información complementaria.

☐ Otros, especificar

14.

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

15.

☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

16.

☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente palabras en la publicación.

17.

☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

20120012B

## **TÍTULO:**

### **VACUNAS NOVEDOSAS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA PANDÉMICA A/H1N1**

#### **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

**[0001]** La invención aquí mostrada se relaciona con las vacunas contra el virus de la influenza, y en particular con las vacunas contra las cepas hipervirulentas del virus de la influenza pandémica A/H1N1. La invención proporciona cepas de virus de la influenza útiles en la producción de la vacuna contra la influenza que porta mutaciones específicas en los segmentos HA y NA.

#### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0002]** La influenza es causada por un virus ARN de la familia orthomyxoviridae. Existen tres tipos de este virus que causan tres tipos diferentes de influenza: los tipos A, B, y C. El virus tipo A de la influenza infecta a los mamíferos (humanos, cerdos, hurones, caballos) y aves. Este tema es de gran relevancia para la humanidad, ya que éste es el tipo de virus que ha ocasionado pandemias por todo el mundo. El virus tipo B de la influenza (que también se conoce sencillamente como influenza B) infecta únicamente a los humanos, ocasionalmente causa brotes locales de gripe. Los virus de influenza C también infectan sólo a humanos, la mayoría de los infectados son jóvenes y raramente causan enfermedad seria.

**[0003]** El virus de la influenza A infecta a una amplia variedad de mamíferos, incluyendo al hombre, los caballos, los cerdos, los hurones y las aves. El patógeno humano principal es asociado con epidemias y pandemias. Existen al menos 15 serotipos de hemaglutininas (H) y 9 serotipos de neuraminidasa (N) conocidos. Se cree que los cerdos y aves son reservorios particularmente importantes que generan fuentes de una diversidad genética y antigénica de virus que pueden ser retransferidos a la población humana a través del contacto cercano entre éstos y los animales. Los virus de la influenza B infectan únicamente a los mamíferos y causan enfermedad, pero generalmente no son tan severos como los de tipo A. A diferencia de los virus de influenza A, los virus de influenza B no tienen serotipos distinguibles. Los virus de la influenza C también infectan únicamente a los humanos, pero raramente causan enfermedad. Son genética y morfológicamente diferentes de los tipos A y B.

**[0004]** En contraste con muchos otros virus, el genoma de la influenza se compone de ARN y no de ADN. El genoma abarca ocho segmentos y sólo las partículas de virus que contienen los ocho segmentos son viables. (Steinhauer DA, Dikehel JJ., *Genetics of Influenza Viruses*. Ann Rev Genet. 2002 36: 305-332).

**[0005]** Existen 4 antígenos presentes en el virus de la influenza, las proteínas hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleocápsida (NA), matriz (M) y nucleocápsida (NP). La NP es un antígeno de tipo específico que se da en 3 formas: A, B y C proporcionando la base de la clasificación de los virus de la influenza humana. La proteína matriz (proteína M) rodea la nucleocápsida y forma de un 35 a un 45% de la masa de la partícula. Se observan dos glicoproteínas superficiales en la superficie como proyecciones en forma de vara. La hemaglutinina (HA) está formada de 2 subunidades, HA1 y HA2. La HA media el acoplamiento de los virus al receptor celular. Las moléculas de neuraminidasa (NA) están presentes en menores cantidades en la envoltura. Las cepas humanas en circulación son notorias por su tendencia a acumular las mutaciones de un año hacia el siguiente y causan epidemias recurrentes.

**[0006]** El virus de la influenza es uno de los pocos virus extraños que cuentan con un genoma en segmentos separados (ocho). La naturaleza segmentada del genoma también permite el cambio de genes enteros entre diferentes cepas extrañas lo que incrementa el potencial para que se formen recombinantes (por medio del intercambio de segmentos de genes si dos virus diferentes infectan a la misma célula). Esto es, si una célula se infecta con dos cepas distintas de influenza, es posible que los segmentos se reclasifiquen para crear virus nuevos que tengan segmentos de cada virus original. Esto puede contribuir al rápido desarrollo de cepas nuevas de gripe en la naturaleza. Se pueden ensamblar nuevos genomas como resultado de la mezcla entre dos virus. El proceso también puede ser duplicado en el laboratorio (y emplearse para elaborar cepas de vacunas). Las cepas aviares y humanas que se recombinan en los cerdos del Lejano Oriente pueden permitir la evolución de cepas virulentas de humanos.

**[0007]** La plasticidad genética de los virus de la influenza tiene también serias implicaciones potenciales con respecto al diseño de la vacuna, la patogenicidad y la capacidad de los virus nuevos para emerger de los reservorios naturales y causar pandemias globales.

**[0008]** El virus pandémico (H1N1) 2009 ha evolucionado en todo el mundo, cambiando desde un patrón clado mezclado inicial a la predominancia de un clado (clado 7) durante el curso de la pandemia. El virus que constituye este clado fue por lo tanto responsable de la mayoría de la carga pandémica esparcida por todo el mundo. La mutación S203T en la secuencia de la proteína hemaglutinina (HA) es específica de las cepas aisladas de clado 7. (Valli MB y otros. *Evolutionary pattern of pandemic influenza (H1N1) 2009 virus in the late phases of the 2009 pandemic*. Influenza PLoS Curr. 2010 Marzo 3: RRN1149).

**[0009]** Entre las cepas aisladas de clado 7 que comprenden la mutación S203T, existe un cambio en la secuencia del gen de la hemaglutinina HA1 al aminoácido correspondiente a la posición 222 (225 en numeración H3) donde el ácido aspártico (D) se cambia a glicina (G), y está asociado con resultados clínicos severos. La mutación D222G se registró entre las cepas aisladas globales de H1N1 pdm en GenBank en diferentes puntos de medición temporal, entre abril y septiembre de 2009. (Chen GW, Shih SR (2009) *Genomic signatures of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus*. Emerg Infect Dis).

**[0010]** La vacuna contra la influenza es una vacuna anual para proteger contra el altamente variable virus de la influenza. Cada vacuna contra la influenza estacionaria inyectada contiene tres virus de influenza: un virus A (H3N2), el virus pandémico 2009 H1N1, y un virus de influenza B. ([www.dcd.gov/vaccines/pubs/vis/downloads/vis-flu.pdf](http://www.dcd.gov/vaccines/pubs/vis/downloads/vis-flu.pdf)). Sin embargo, la vacuna contra la gripe pandémica sólo es débilmente efectiva contra los virus de influenza H1N1 que portan la mutación D222G en la proteína HA.

**[0011]** Por lo tanto, se necesitan urgentemente las cepas virales y los antígenos derivados del virus que genera un título robusto de anticuerpo contra las variantes D222G de H1N1.

## RESUMEN DE LA INVENCION

**[0012]** La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para preparar vacunas contra las versiones hipervirulentas y/o resistentes al oseltamivir del virus de la influenza pandémica A H1N1. Se proporcionan las composiciones de las vacunas que incluyen mutaciones en el residuo D222 de HA y residuo S275 de NA.

**[0013]** Esta invención proporciona una vacuna de virus contra la influenza que abarca un virus de influenza que contiene al menos: un segmento de gen de hemaglutinina (HA) que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 34, derivada de la cepa aislada del virus 1 de la influenza pandémica del virus de influenza A H1/N1 y un segmento de gen de neuraminidasa (NA) que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 derivada de la cepa aislada del virus 1 de la influenza pandémica del virus de influenza A H1/N1.

**[0014]** En una de las implementaciones en particular, el segmento de gen HA comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica de segmento 4 del virus 1 (SEQ ID NO: 4). En algunas versiones del segmento de gen HA se comprende una secuencia específica HA de clado 7 de influenza pandémica de virus de influenza A H1/N1.

**[0015]** En una de las implementaciones en particular, el segmento del gen HA comprende una mutación del residuo D222 del virus de influenza A H1/N1 de la influenza pandémica de tipo silvestre. En una de las implementaciones en particular, el segmento del gen HA comprende una mutación D222E. En algunas de las implementaciones en particular, el segmento del gen HA comprende una mutación S203T relacionada con el virus de la influenza A H1/N1 de la influenza pandémica de tipo silvestre.

**[0016]** La invención se relaciona con vacunas en las cuales el segmento del gen HA comprende, además, una o más mutaciones de P83S e I321V.

**[0017]** En una de las implementaciones en particular, el segmento del gen NA comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica de segmento 6 del virus 1 (SWQ ID NO: 6). El segmento del gen NA comprende una mutación Y275H relativa a una influenza pandémica de tipo silvestre del virus de influenza A H1/N1.

**[0018]** La invención se relaciona con vacunas en las que el segmento del gen NA además comprende una o más de las mutaciones I106V, D248N.

**[0019]** La vacuna de la invención puede comprender además: c) un segmento del gen matriz (MA) que codifica un péptido M1 que abarca una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, derivada de la cepa aislada del virus 1 de la influenza pandémica del virus de influenza A H1N1.

**[0020]** En una de las implementaciones en particular, el segmento del gen MA comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica del segmento 7 del virus 1 (SEQ ID NO: 7).

**[0021]** En algunas de las implementaciones en particular, el segmento del gen matriz (MA) codifica un péptido M2 abarcando una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51, derivada de la cepa aislada del virus 1 de la influenza pandémica del virus de influenza A H1N1. En algunas de las implementaciones en particular, el péptido M1 comprende una mutación A198P.

**[0022]** La invención se refiere a un método aquí revelado para inmunizar a un paciente contra el virus de la influenza, que incluye como un paso administrar una vacuna de influenza al paciente.

**[0023]** La invención se refiere a un método aquí revelado para inmunizar a un paciente contra un virus de influenza hipervirulenta que incluye como un paso administrar una vacuna de influenza al paciente.

**[0024]** La invención se refiere a un método para inmunizar a un paciente contra un virus de influenza resistente al oseltamivir que incluye como un paso administrar una vacuna de influenza al paciente.

**[0025]** La invención se refiere a una vacuna que aquí se revela, en la que la vacuna es una vacuna de reordenamiento. En algunas de las implementaciones, el virus de reordenamiento de la influenza se obtiene por medio de un reordenamiento clásico.

**[0026]** La invención se refiere a una vacuna que aquí se revela, misma que es una vacuna viva atenuada o una vacuna inactiva. En algunas de las implementaciones, la vacuna se formula para ser administrada de manera oral o intranasal.

**[0027]** La invención se refiere a un método de preparación de vacuna para la inmunización de un sujeto contra una cepa de virus de influenza hipervirulenta, que incluye como un paso mezclar un virus de la influenza que se revela aquí con un portador y de manera opcional un adyuvante.

**[0028]** Estos y otros aspectos serán evidentes a partir de la descripción subsecuente de la implementación en particular preferente tomada junto con las ilustraciones siguientes, aunque las variaciones y modificaciones de la misma puedan verse afectadas sin partir del espíritu y el campo de acción de los nuevos conceptos de la revelación.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

**[0029]** Las siguientes ilustraciones forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar más detalladamente ciertos aspectos de la presente revelación; las invenciones que podrán entenderse de mejor manera si se hace referencia a una o más de estas ilustraciones junto con la descripción detallada de las implementaciones en particular específicas que aquí se presenten. La patente o la presentación de la solicitud contiene al menos una ilustración realizada a color. La oficina proporcionará copias de la presente patente o de la publicación de la solicitud de la patente con ilustraciones a color una vez que ésta sea requerida y que la cuota necesaria sea cubierta.

**[0030]** La FIGURA 1 muestra ejemplos de la cuantificación de la carga viral mediante PCR en tiempo real.

**[0031]** La FIGURA 2 muestra un arreglo muestra para la detección de AH1N1 realizada mediante PCR en tiempo real.

**[0032]** Las FIGURAS 3A y 3B muestran una representación gráfica de la interfaz del termociclador Light Cycler 2.0 en tiempo real mostrando curvas fluorescentes (Fig. 3A) Muestra Clínica (Fig. 3B) detección RNaseP (RP).

**[0033]** La FIGURA 4A muestra la adaptación del virus de influenza HZFLUJAL en la línea celular VERO. El virus fue capaz de replicarse de manera eficiente hasta en 4 subcultivos en las células VERO. La FIGURA 4B muestra las etapas de adaptación del virus de influenza HZFLUJAL en la línea celular MDCK. El virus de influenza HZFLUJA pudo replicarse de manera eficiente después de 3 subcultivos en las células MDCK.

**[0034]** La FIGURA 5 muestra los anticuerpos totales contra la influenza p/AH1N1 detectados por ELISA.

**[0035]** La FIGURA 6A muestra los anticuerpos IgM contra la influenza p/AH1N1 detectados en suero por ELISA.

**[0036]** La FIGURA 6B muestra los anticuerpos IgG contra la influenza p/AH1N1 detectados en suero por ELISA.

**[0037]** La FIGURA 7A muestra los anticuerpos IgG<sub>2</sub>A contra la influenza p/AH1N1 detectados en suero por ELISA. La FIGURA 7B muestra la función dosis-respuesta del IgG<sub>2</sub>A contra la influenza p/AH1N1 detectada en suero por ELISA.

**[0038]** La FIGURA 8A muestra los anticuerpos IgA contra la influenza p/AH1N1 detectada en mucosa respiratoria por ELISA. La FIGURA 8B muestra la función dosis-respuesta IgA contra la influenza p/AH1N1 detectada en mucosa respiratoria por ELISA.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0039]** Los términos empleados en la presente especificación generalmente cuentan con su propio significado ordinario dentro de la técnica, del contexto de la invención, y dentro del contexto específico en el cual se utiliza cada término. Ciertos términos que son utilizados para describir la invención se discutirán más adelante o en algún otro segmento de la especificación para proporcionar una guía adicional al practicante con respecto a la descripción de la invención. Por conveniencia, ciertos términos pueden destacarse, ya sea utilizando letra cursiva y/o comillas. El uso del resaltado que se le da al término no influye en el enfoque y significado del mismo; el enfoque y el significado del término es igual, en el contexto que se está tratando, aún cuando éste no haya sido resaltado. Se apreciará que se puede expresar lo mismo en más de una manera.

**[0040]** En consecuencia se puede utilizar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos que aquí se discutan, y no hay un significado especial para ser empleado con un término que se elabore o discuta aquí. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. El empleo de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de la presente especificación incluyendo los ejemplos de cualquiera de los términos aquí discutidos es únicamente con propósitos ilustrativos, y de ninguna manera se limita el enfoque y significado de la invención o de algún término ejemplificado. De la misma forma, la invención no está limitada a las varias de las implementaciones en particular provistas en la presente especificación.

**[0041]** A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos aquí empleados cuentan con el mismo significado con el que pueden entenderse en cualquiera de las técnicas ordinarias a las que pertenece la presente invención. En caso de entrar en conflicto, el presente documento, incluyendo sus definiciones será la referencia válida. Las siguientes referencias proporcionan, de acuerdo a la técnica, una definición general de los términos empleados en la presente invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd Ed.1993); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., Cambridge University Press. 1990); The Glossary of Genetics, 5th ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Margham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991).

**[0042]** Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con cultivos de células y tejidos, biología molecular y proteínas y Química e Hibridación de polinucleótidos u oligonucleótidos, así como sus técnicas que aquí se describen son bien conocidas y comúnmente usadas en el estado de la técnica. Las técnicas estándar se usan para recombinantes de ADN, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (e.g. electroporación y lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como comúnmente se obtienen en el estado del arte o como aquí se describe. A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención empleará métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del estado de la técnica, muchas de las cuales se describen en el presente para efectos de ilustración. Tales técnicas se explican a fondo en la literatura. Ver e.g., Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

**[0043]** Los virus de Influenza A contienen genomas compuestos de ocho segmentos separados de ARN de sentido negativo como se muestra en la Tabla 1 a continuación. (Steinhauer DA, Skehel JJ., *Genetics of influenza viruses*. *Ann Rev Genet*. 2002 36: 305-332). Las cepas humanas circulantes son notorias por su tendencia a acumular mutaciones de un año a otro y causar epidemias recurrentes. Sin embargo, la naturaleza segmentada del genoma también permite el intercambio de genes enteros entre diferentes cepas virales. La plasticidad genética de los virus de influenza tiene también serias implicaciones potenciales con respecto al diseño de la vacuna, de la patogenicidad, y la capacidad de virus novedosos para emerger de reservorios naturales y causar pandemias mundiales.

| Tabla 1. El genoma del virus de influenza consiste de s/s de ARN sentido (-) en 8 segmentos |             |                |                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------|---------------------------------------|
| Segmento:                                                                                   | Tamaño (nt) | Polipéptido(s) | Función                               |
| 1                                                                                           | 2341        | PB2            | Transcriptasa: enlace de capucha      |
| 2                                                                                           | 2341        | PB1            | Transcriptasa: elongación             |
| 3                                                                                           | 2233        | PA             | Transcriptasa: protease (¿?)          |
| 4                                                                                           | 1778        | HA             | Hemaglutinina                         |
| 5                                                                                           | 1565        | NP             | Nucleoproteína: enlace ARN            |
| 6                                                                                           | 1413        | NA             | Neuraminidasa: liberación del virus   |
| 7                                                                                           | 1027        | M1             | Proteína matriz: componente de virión |
|                                                                                             |             | M2             | Proteína integral de membrana         |
|                                                                                             |             |                |                                       |
| 8                                                                                           | 890         | NS1            | No estructural: nuclear               |
|                                                                                             |             | NS2            | No estructural: núcleo + citoplasma   |

[0044] Un total de 950 virus fueron aislados por cultivo celular, de los cuales, se obtuvieron secuencias parciales a través de secuenciación capilar: 193 Neuraminidasas (NA) y 197 Hemaglutinina (HA). Ya que las NA y las HA son las secuencias más variables en el AH1N1, un análisis *in silico* (análisis filogenético Y BLAST) demostró que todas las 386 (secuencias HA y NA) pueden estar agrupadas en 20 grupos; por lo tanto, el genoma completo de un miembro representativo de cada grupo fue pirosecuenciado en un equipo de Pirosecuenciación 454 Titanium Roche (ROCHE). Se obtuvo un total de 20 genomas completos de AH1N1, cada AH1N1 consiste de 8 genes.

[0045] Los datos de secuenciación mostraron cuatro aislamientos virales con tres mutaciones diferentes: (i) un virus pAH1N1 que posee mutaciones en NA (oseltamivir<sup>R</sup>), HA (Hipervirulencia) y segmentos de Matriz (Virus 1); (ii) un virus pAH1N1 que posee mutaciones en NA y segmentos de Matriz (Virus 2); (iii) un virus pAH1N1 que posee mutaciones en segmento de matriz (MA) (Virus 3); y (iv) un virus de pAH1N1 que posee mutaciones en segmento de neuraminidasa (NA) (Virus 4).

[0046] Un cambio en la secuencia del gen de hemaglutinina HA1 en el aminoácido correspondiente a la posición 222 (225 en la numeración H3) en donde el ácido aspártico (D) se cambia a glicina (G) se asocia con resultados

clínicos severos. La mutación D222G fue observada en aislamientos internacionales H1N1pdm en el GenBank (banco de datos de secuencias genéticas) en distintos puntos de medición temporal durante abril a septiembre de 2009. (Chen GW, Shih SR (2009) Genomic signatures of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis*).

**[0047]** El enlace preferencial del virus de influenza al ácido siálico - $\alpha$ 2,3-galactosa (receptor  $\alpha$ 2,3) o ácido siálico - $\alpha$ 2,6-galactosa (receptor  $\alpha$ 2,6) puede determinar su tropismo siendo que los receptores  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 son dominantes en células respiratorias inferiores y superiores respectivamente (Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006; 440(7083):435-6).

**[0048]** Recientes análisis de microarreglos sugieren que la sustitución de hemagglutinina (HA) D222G puede causar un cambio de receptores  $\alpha$ 2,6 a la especificidad de los receptores  $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6 mezclados lo que podría incrementar el enlace hacia receptores  $\alpha$ 2,3 y contribuir con la gravedad de la enfermedad. (Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*. 2006;355(5):1143-55). Esta posición parece influenciar a la especificidad de enlace del receptor y la diferencia de D a G entre dos variantes de virus 1918 (*Id.*) se correlaciona con un cambio de una preferencia ácido siálico  $\alpha$ 2-6-ligado a una especificidad dual  $\alpha$ 2-3/ $\alpha$ 2-6, i.e. cabe la posibilidad de que pueda hacer al virus más propenso a infectar más profundamente en los conductos de aire en donde las células que expresan receptores  $\alpha$ 2-3 son más abundantes, de esta manera, causando hipervirulencia.

**[0049]** Sin embargo, no se observaron grupos filogenéticos distintos de casos de gravedad con sustitución D222G (Mak GC et al., Association of D222G substitution in hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Eurosurveillance*, Volume 15, Issue 14, 08 April 2010)

**[0050]** Todos los virus que se observó que contienen cambios en HA1 posición 222 pertenecen a un subclado de virus H1N1 pandémicos caracterizados por la sustitución S203T en HA1 (característica del clado 7) el cual también está rodeado de una bolsa de aminoácidos que expone una región antigénica específica para esta cepa hipervirulenta y el resto de las cepas de AH1N1. Este subclado forma la

19

gran mayoría de virus pandémicos en Europa y el resto del hemisferio norte. Con respecto al hemisferio sur, este subclado también se encuentra muy esparcido.

**[0051]** Con base en datos compartidos con la OMS disponibles en la actualidad la prevalencia de la sustitución D222G es menor a 1.8% (52 detecciones entre más de 2755 secuencias HA). De 364 casos fatales analizados, los virus de 26 casos (7.1%) tenían la sustitución D222G. La información clínica sobre potenciales condiciones médicas esenciales en estos casos es limitada. Los virus pandémicos (H1N1) de 2009 con sustitución D222G han sido antigénicamente similares al virus A/California/7/2009 (H1N1), el virus de la vacuna recomendada por la OMS.

**[0052]** Entre los mismos virus A (H1N1)2009 mencionados anteriormente se encontraron (i) una mutación Gly222 en la hemaglutinina (HA) y (ii) una mutación Tyr275 en la neuraminidasa (NA) asociada con resistencia al Oseltamivir (McKimm-Breschkin JL. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors—a review. *Antiviral Res* 2000; 47:1–17; Collins PJ et al. Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine* 27 (2009) 6317–6323). Ya que ambas mutaciones se relacionan con fenotipos importantes (hipervirulencia y resistencia al Oseltamivir), y regiones antigénicas se asocian con esas mutaciones, la presente vacuna candidata puede reconocer eficientemente ambas cepas mutantes y el tipo silvestre de AH1N1.

**[0053]** Tres variantes del virus D222G portan la sustitución H275Y en la neuraminidasa (NA) asociada con la resistencia al oseltamivir. Reporte de la OMS. Revisión preliminar de la sustitución del aminoácido D222G en la hemaglutinina de los virus pandémicos de influenza A (H1N1) de 2009. 28 de diciembre de 2009 ([www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165\\_2009\\_2812\\_review\\_d222g\\_amino\\_acid\\_substitution\\_in\\_ha\\_h1n1\\_viruses.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165_2009_2812_review_d222g_amino_acid_substitution_in_ha_h1n1_viruses.pdf))

**[0054]** La vacuna pandémica disponible actualmente también reconoce a los mutantes hipervirulentos y de resistencia al oseltamivir, pero aunque la mutación se sitúa en la cavidad de enlace del receptor y no en el sitio antígeno de la hemaglutinina H1, una caracterización antigénica preliminar llevada a cabo en el Instituto Sueco de Control de Enfermedades Infecciosas y en nuestro laboratorio mostró una reactividad reducida significativa de virus mutantes con antisuero contra la vacuna pandémica actual en comparación con la cepa pandémica de tipo silvestre AH1N1. Por lo tanto, la vacuna actual no es tan eficiente como la

presente vacuna candidata para reconocer estas nuevas cepas mutantes que se expandieron rápidamente en todo el mundo.

[0055] Una mutación en el extremo 3' del segmento 7 (segmento Matriz) del genoma viral muestra similitud (60%) con el segmento B M de Influenza. Se ha reportado anteriormente que esta mutación aumenta la respuesta inmune específica en humanos y también podría conferir protección contra la Influenza B. No obstante, la inmunidad mediada por células

Tabla 2. Secuencia del genoma del virus pAH1N1 con mutaciones en NA (oseltamivir<sup>K</sup>), HA( hipervirulencia:)y segmentos de matriz (Virus 1)

| Segment 1—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TATGGAGAGAATAAAAGAACTGAGAGATCTAATGTTCGTCAGTCCCGCACTCGCGAGA<br>TACTCACTAAGACCACTGTGGACCATATGGCCATAATCAAAAAGTACACATCAGGA<br>AGGCAAGAGAAGAACCCTCGCACTCAGAATGAAGTGGATGATGGCAATGAGATACCC<br>AATTACAGCAGACAAGAGAATAATGGACATGATTCCAGAGAGGAATGAACAAGGA<br>CAAACCCTCTGGAGCAAAACAACGATGCTGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACC<br>TCTGGCCGTAACATGGTGAATAGGAATGGCCCAACAACAAGTACAGTTCATTACC<br>CTAAGGTATATAAACTTATTTTCGAAAAGGTCGAAAGGTTGAAACATGGTACCTTCG<br>GCCCTGTCCACTTCAGAAATCAAGTTAAATAAGGAGGAGAGTTGATACAAACCCT<br>GGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATTATGGAAGTTGTTTC<br>CCAAATGAAGTGGGGCAAGAATACTGACATCAGAGTCACAGCTGGCAATAACAAA<br>AGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAGGATTGTAATAATTGCTCCCTTGATGGTGGCGTACA<br>TGCTAGAAAGAGAATTGGTCCGTAAAACAAGGTTTCTCCCAGTAGCCGGCGGAACA<br>GGCAGTGTTTATATTGAAGTGTGCACTTAACCCAAGGGACGTGCTGGGAGCAGATG<br>TACACTCCAGGAGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGACCAAAGTTTGATTATCGC<br>TGCTAGAAACATAGTAAGAAGAGCAGCAGTGTCAGCAGACCCATTAGCATCTCTCTT<br>GGAAATGTGCCACAGCACACAGATTGGAGGAGTAAGGATGGTGGACATCCTTAGAC<br>AGAATCCAAGTGAAGAACAGCCGTAGACATATGCAAGGCAGCAATAGGGTTGAGG<br>ATTAGCTCATCTTTCACTTTTGGTGGGTTCACTTTCAAAAGGACAAGCGGATCATCA<br>GTCAAGAAAGAAGAAGAAGTGCTAACGGGCAACCTCCAAACACTGAAAATAAGAG<br>TACATGAAGGGTATGAAGAATTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATTCTC<br>AGAAAGGCAACCAGGAGATTGATCCAGTTGATAGTAAGCGGGAGAGACGAGCAGT<br>CAATTGCTGAGGCAATAATTGTGGCCATGGTATTCTCACAAGAGGATTGCATGATCA<br>AGGCAGTTAGGGGCGATCTGAACCTTTGTCAATAGGGCAAACCAGCGACTGAACCCC<br>ATGCACCAACTCTTGAGGCATTTCAAAAAGATGCAAAAAGTGCTTTTCCAGAACTGG<br>GGAATTGAATCCATCGACAATGTGATGGGAATGATCGGAATACTGCCCGACATGAC<br>CCCAAGCACGGAGATGTCGCTGAGAGGGATAAGAGTCAGCAAAATGGGAGTAGAT<br>GAATACTCCAGCACGGAGAGAGTGGTAGTGAGTATTGACCGATTTTAAAGGGTTAG<br>AGATCAAAGAGGGGAACGTACTATTGTCTCCCGAAGAAGTCAGTGAAACGCAAGGAA<br>CTGAGAAGTTGACAATACTTATTCGTCATCAATGATGTGGGAGATCAATGGCCCTG<br>AGTCAGTGCTAGTCAACACTTATCAATGGATAATCAGGAACTGGGAAATTGTGAAA<br>ATTCAATGGTCACAAGATCCCACAATGTTATACAACAAAATGGAATTTGAACCATTT<br>CAGTCTCTTGTCCTAAGGCAACCAGAAGCCGGTACAGTGGATTGTAAGGACACTG<br>TTCCAGCAAATGCGGGATGTGCTTGGGACATTTGACACTGTCCAAATAATAAACTT |

CTCCCCCTTTGCTGCTGCTCCACCAGAACAGAGTAGGATGCAATTTTCCTCATTGACTG  
TGAATGTGAGAGGATCAGGGTTGAGGATACTGGTAAGAGGCAATTCTCCAGTATTC  
AATTACAACAAGGCAACCAAACGACTTACAGTTCTTGGAAGGATGCAGGTGCATT  
GACTGAAGATCCAGATGAAGGCACATCTGGGGTGGAGTCTGCTGTCCTGAGAGGAT  
TTCTCATTTTGGGCAAGAAGACAAGAGATATGGCCCAGCATTAAGCATCAATGAA  
CTGAGCAATCTTGCAAAAGGAGAGAAAGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGGGACGT  
AGTGTTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAG  
CGACCAAAGAATTCCGGATGGCCATCAATTAGTGTCTGAATTGTT

Segment 2—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 2)

TTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCCTAAAAATTCCAGCGCAAAATGCCAT  
AAGCACCACATTCCCTTATACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAG  
GATACACCATGGACACAGTAAACAGAACACACCAATACTCAGAAAAGGGAAAGTG  
GACGACAAACACAGAGACTGGTGCACCCCAGCTCAACCCGATTGATGGACCACTAC  
CTGAGGATAATGAACCAAGTGGGTATGCACAAACAGACTGTGTTCTAGAGGCTATG  
GCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGAATATTTGAGAATTCATGCCTTGAAACAATG  
GAAGTTGTTCAACAAACAAGGGTAGATAAACTAACTCAAGGTCGCCAGACTTATGA  
TTGGACATTAAACAGAAATCAACCGGCAGCAACTGCATTGGCCAACACCATAGAAG  
TCTTTAGATCGAATGGCCTAACAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTTAA  
AGGATGTAATGGAATCAATGAACAAAGAGGAAATAGAGATAACAACCCACTTTCAA  
AGAAAAAGGAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAGATGGTCACGCAAAGAACAA  
TAGGGAAGAAAAAACAAGACTGAATAAGAGAGGCTATCTAATAAGAGCACTGAC  
ATTAAATACGATGACCAAAGATGCAGAGAGAGGCAAGTTAAAAAGAAGGGCTATC  
GCAACACCTGGGATGCAGATTAGAGGTTTCGTATACTTTGTTGAAACTTTAGCTAGG  
AGCATTTGCGAAAAGCTTGAACAGTCTGGGCTCCAGTAGGGGGCAATGAAAAGAA  
GGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACACAGAGA  
TTTCTTTCACAATCACTGGGGACAACACTAAGTGGAAATGAAAATCAAAATCCTCGAA  
TGTTCTTGCGCATGATTACATATATCACCAGAAATCAACCCGAGTGGTTCAGAAACA  
TCCTGAGCATGGCAACCATAATGTTCTCAAACAAAATGGCAAGACTAGGGAAAGGG  
TACATGTTGAGAGTAAAAGAATGAAGATTCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCT  
AGCAAGCATTGACCTGAAGTACTTCAATGAATCAACAAAGAAGAAAATTGAGAAAA  
TAAGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCATCACTGAGTCCTGGGATGATGATGGGCA  
TGTTCAACATGCTAAGTACGGTCTTGGGAGTCTCGATACTGAATCTTGGACAAAAGA  
AATACACCAAGACAATATACTGGTGGGATGGGCTCCAATCATCCGACGATTTTGCTC  
TCATAGTGAATGCACCAAACCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGACAGATTCTAC  
AGGACCTGCAAGTTAGTGGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCCTATATAAATAA  
GACAGGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCTAATTTT  
AGCATGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGACATGAG  
TATTGGAGTAACAGTGATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGACCTGCAA  
CGGCCCAGATGGCTCTTCAATTGTTTCATCAAAGACTACAGATACACATATAGGTGCC

ATAGGGGAGACACACAAATTCAGACGAGAAGATCATTTGAGTTAAAGAAGCTGTGG  
GATCAAACCCAATCAAAGGTAGGGCTATTAGTATCAGATGGAGGACCAAACCTTATA  
CAATATACGGAATCTTCACATTCCTGAAGTCTGCTTAAATGGGAGCTAATGGATGA  
TGATTATCGGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCCTTTGTCAGTCATAAAGAGAT  
TGATTCTGTAAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGA  
ATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCCCTGGATTCCCAAAGAGGAATCGTTCTATTCT  
CAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCA  
ATCTATTTCGAGAAATTTTCCCTAGCAGTTCATATAGGAGACCGGTTGGAATTTCTA  
GCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGGGTCGACTTCGAG  
TCTGGACGGATCAAGAAAGAAGAGTTCTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATT  
GAAGAACTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAACTTGTCTTCATGAAA

Segment 3—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 3)

TCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCG  
GAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATCGAACTAACAAGTTTG  
CTGCAATATGCACACATTTGGAAGTTTGTTCATGTATTCGGATTTCCATTTTCATCGA  
CGAACGGGGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGTGACCCGAATGCACTATTGAAGC  
ACCGATTTGAGATAATTGAAGGAAGAGACCGAATCATGGCCTGGACAGTGGTGAAC  
AGTATATGTAACACAACAGGGGTAGAGAAGCCTAAATTTCTTCCTGATTTGTATGAT  
TACAAAGAGAACCGGTTTATTGAAATTGGAGTAACACGGAGGGAAGTCCACATATA  
TTACCTAGAGAAAGCCAAACAAAATAAAATCTGAGAAGACACACATTCACATCTTTTC  
ATTCACTGGAGAGGAGATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCTTGACGAAGAGAGCA  
GGGCAAGAATCAAACTAGGCTTTTCACTATAAGACAAGAAATGGCCAGTAGGAGT  
CTATGGGATTCCTTTGTCAGTCCGAAAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATT  
TGAGATTACAGGAATATGCGCAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCACCGAACTTCTC  
CAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTAGATGGATTGAGCCGAACGGCTGCATTGA  
GGGCAAGCTTTCCCAAATGTCAAAAGAAGTGAACGCCAAAATTGAACCATTCTTGA  
GGACGACACCACGCCCCCTCAGATTGCCTGATGGGCCTCTTTGCCATCAGCGGTCAA  
AGTTCCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCGAGTCACGAGGGG  
GAGGGAATACCACTATATGATGCAATCAATGCATGAAGACATTCTTTGGCTGGAA  
AGAGCCTAACATAGTCAAACCACATGAGAAAGGCATAAATCCCAATTACCTCATGG  
CTTGGAAGCAGGTGCTAGCAGAGCTACAGGACATTGAAAATGAAGAGAAGATCCCA  
AGGACAAAGAACATGAAGAGAACAAGCCAATTGAAGTGGGCACTCGGTGAAAATA  
TGGCACCAGAAAAAGTAGACTTTGATGACTGCAAAGATGTTGGAGACCTTAAACAG  
TATGACAGTGATGAGCCAGAGCCCAGATCTCTAGCAAGCTGGGTCCAAAATGAATT  
CAATAAGGCATGTGAATTGACTGATTCAAGCTGGATAGAACTTGATGAAATAGGAG  
AAGATGTTGCCCCGATTGAACATATCGCAAGCATGAGGAGGAACTATTTTACAGCA  
GAAGTGTCCCACTGCAGGGCTACTGAATACATAATGAAGGGAGTGACATAAATAC  
GGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAGCTGATCCCAATGAT  
AAGCAAATGTAGGACCAAAGAAGGAAGACGGAAAACAAACCTGTATGGGTTCATTA

TAAAAGGAAGGTCTCATTTGAGAAATGATACTGATGTGGTGAACCTTTGTAAGTATGG  
AGTTCTCACTCACTGACCCGAGACTGGAGCCACACAAATGGGAAAAATACTGTGTTCT  
TTGAAATAGGAGACATGCTCTTGAGGACTGCGATAGGCCAAGTGTGAGGCCCATG  
TTCCTATATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGCATGGA  
ACTGAGGCGCTGCCCTTCTTCAGTCTCTTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGA  
GTCTTCTGTCAAAGAGAAAGACATGACCAAGGAATTCTTTGAAAACAAATCGGAAA  
CATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAGGGGAGTGGAGGAAGGCTCTATTGGGAAAGTG  
TGCAGGACCTTACTGGCAAAATCTGTATTCAACAGTCTATATGCGTCTCCACAACCTT  
GAGGGGTTTTCGGCTGAATCGAGAAAATTGCTTCTCATTGTTCAAGGCACTTAGGGAC  
AACCTGGAACCTGGAACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATCGAGGAGTG  
CCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCATCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACA  
CATGCACTGAAGTAGTTGTGGCAATGCTAC

Segment 4—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 4)

AGCAAAAGCAGGGGAAAACAAAAGCAACAAAAATGAAGGCAATACTAGTAGTTCT  
GCTATACACATTTGCAACCGCAAATGCAGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAA  
CAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACT  
CTGTAAACCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACCTAAGAGGGGTA  
GCCCCATTGCATTTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAG  
TGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTTCA  
GACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCA  
ATTGAGCTCAGTGTCAATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATG  
GCCCGATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAA  
AAAGCTTCTACAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAG  
CTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATT  
CACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT  
GTTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAG  
ACCCAAAGTGAGGGAACGAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGGACACTAGTAGAG  
CCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGC  
ATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACCCAGTCCA  
CGATTGCAATACAACCTTGTCAGACACCCAAAGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATT  
TCAGAATATACATCCGATCACAATTGGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAA  
AATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTAT  
TTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGG  
TACGGTTATCACCATCAAAATGAGCAGGGGTGAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAG  
CACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGAT  
GAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAAGAATAG  
AGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCCTGGACATTTGGACTTACAATGCCG  
AACTGTTGGTTCTATTGGAAAATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGA  
AGAACTTATATGAAAAGGTAAGAAGCCAGTTAAAAAACAATGCCAAGGAAATTGGA

AACGGCTGCTTTGAATTTTACCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGTCAAA  
AATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGA  
AATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTC  
AACTGTCGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGAT  
GTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAACATTAGGATTTCAGAAG  
C

Segment 5—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 5)

ATCAATCACTGAGTGACATCGAAGCCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATAT  
GAACAAATGGGAGACTGGTGGGGAGCGCCAGGATGCCACAGAAATCAGAGCATCTGT  
CGGAAGAATGATTGGTGGGAATCGGGAGATTCTACATCCAAATGTGCACTGAACTCA  
AACTCAGTGATTATGATGGACGACTAATCCAGAATAGCATAACAATAGAGAGGATG  
GTGCTTTCTGCTTTTGATGAGAGAAGAAATAAATACCTAGAAGAGCATCCCAAGTGCT  
GGGAAGGACCCTAAGAAAACAGGAGGACCCATATATAGAAGAATAGACGGAAAGT  
GGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAGAAGAAATAAGGAGAGTTTGGCGCCAA  
GCAAACAATGGCGAAGATGCAACAGCAGGTCTTACTCATATCATGATTTGGCATTCC  
AACCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAAGAGCGCTTGTTCCGACCGGAATGGA  
TCCCAGAATGTGCTCTCTAATGCAAGGTTCAACACTTCCCAGAAGGTCTGGTGCCGC  
AGGTGCTGCGGTGAAGAGAGTTGGAACAATAGCAATGGAGTTAATCAGAATGATCA  
AACGTGGAATCAATGACCGAAATTTCTGGAGGGGTGAAAATGGACGAAGGACAAG  
GGTTGCTTATGAAAGAATGTGCAATATCCTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCTGCCCCA  
GAGGGCAATGATGGATCAAGTAAGAGAAAGTCGAAACCCAGGAAACGCTGAGATT  
GAAGACCTCATTTTCTGGCACGGTCAGCACTCATTCTGAGGGGATCAGTTGCACAT  
AAATCCTGCCTGCCTGCTTGTGTGTATGGGCTTGCAAGTAGCAAGTGGGCATGACTTT  
GAAAGGGAAGGGTACTCACTGGTTCGGGATAGACCCATTCAAATTACTCCAAAACAG  
CCAAGTGGTCAGCCTGATGAGACCAAATGAAAACCCAGCTCACAAGAGTCAATTGG  
TGTGGATGGCATGCCACTCTGCTGCATTTGAAGATTTAAGAGTATCAAGTTTCATAA  
GAGGAAAGAAAGTGATTCCAAGAGGAAAGCTTTCCACAAGAGGGGTCCAGATTGCT  
TCAAATGAGAATGTGGAAACCATGGACTCCAATACCCTGGAACCTAAGAAGCAGATA  
CTGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAATACCAATCAACAAAAGGCATCCGCA  
GGCCAGATCAGTGTGAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTTGAAAGA  
GCAACCGTTATGGCAGCATTAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATGCG  
AACAGAAGTTATAAGAATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAAGATTTGTCCTTCCAGG  
GGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCC  
TTTGACATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGAC  
AGTTGAGGAAAAATACCCTTGTTTCTACT

Segment 6—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 6)

ATGAATCCAAACCAAAGATAATAACCATTGGTTCGGTCTGTATGACGATTGGAATG  
GCTAACTTAATATTACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATT

CAACTTGGGAATCAAATCAGATTGAAACATGCAATCAAAGCGTCATTACTTATGA  
AAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTAAACATCAGCAACACCAACTTTGCTGC  
TGGACAGTCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTCTGCCCTGTTAGT  
GGATGGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTATAAGAATCGGTTCCAAGGGGGATGT  
GTTTGTCAATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGGAATGCAGAACCTTCTTC  
TTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACAG  
GAGCCCATATCGAACCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAA  
CTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTATGATGGCATCAATTG  
GCTAACAAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACA  
ACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAA  
GAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCA  
AGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAA  
ATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGA  
TTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTG  
GGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTT  
CGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTA  
ATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTTTGGATA  
GGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAA  
CGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAA  
ATGAGTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTTTCAGCATCCAGAACTAACAGGGCTG  
GATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAA  
CACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTAACAGTGACACTGT  
GGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTAA

Segment 7—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 7)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCC  
CTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGTCTTTGCAGGAAAGAACACAGA  
TCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTGTCACCTCTGACTAA  
GGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCG  
TAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGGATA  
GAGCAGTTAACTATACAAGAAGCTCAAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAG  
GAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCCTTGCCAGTTGCATGGGCCTCATATAC  
AACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGT  
GAACAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCACCAAT  
CCACTAATCAGGCAATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAGGCTAT  
GGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGAAAGGAGAAGACGTCCAAAAGCTGGCA  
GAAGAGCTGCAAAGCAACATTGGAGTATTGAGATCTCTTGGAGCAAGTCAAAAGAG  
TGGGGAAGGAATTGCAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAA  
ATTCAGCTCTTGTGAAGAAATATCTATGCTCGAACCATTTAGATTCTTTCAATTTGT  
TCTTTTATCTTATCAGCTCTCCATTTTCATGGCTTGGACAAGGCATTATCAAAAAGAG

GAGAGAAAAGAAAAGGTCCAAACAAAGAGACAAACAGAGAGGTATCAATTTGACA  
CAGTTACCAAAAAGAAATCCAGGCCAAAGAAACAAAGGAAGTACTCTCTGACAACA  
AGGGTGACCACAAGGGGCTTTCTGCCGGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGAC  
TAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGG  
TCTGAAAGATGACCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGC  
AGATGCAGCGATTCAAGTCCTCTCGTCATTGCAGCAATATCATTGGGATCTTGCACC  
TGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGCTTTAAATA  
CGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAAT  
ATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAG  
AGCTAGAGTAA

Segment 8—VIRUS 1 (SEQ ID NO: 8)

AACATAATGGACTCCAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCAT  
ATCCGCAAGCGATTTCAGACAATGGATTGGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTC  
CGCCGAGATCAAAAGTCCTTAAAAGGAAGAGGCAACACCCTTGGCCTCGATATCGA  
AACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATCGTGGAATGGATCTTGAAAGAGGAATCCA  
GCGAGACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGACA  
TGACCCTCGAGGAAATGTCACGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAAAAGATA  
ATAGGCCCTCTTTGCGTGCGATTGGACCAGGCGATCATGGAAAAGAACATAGTACT  
GAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGGC  
TTTCACTGAGGAGGGAGCAATAGTTGGAGAAATTTACCATTACCTTCTCTTCCAGG  
ACATACTTATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATG  
GAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTCGCTTGGAGAACT  
GTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGA  
GCAATTGGGACAGAAATTTGAGGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACA  
GATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATAACATTTATGCAAGCCTTACAA  
CTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAAGT  
ATAA

Tabla 3. Secuencia del genoma del virus pAH1N1 con mutaciones en NA y segmentos de matriz (Virus 2)

Segment 1—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 9)

TATGGAGAGAATAAAGAAGTGAAGAGATCTAATGTCGCAGTCCCGCACTCGCGAGA  
TACTACTAAGACCACTGTGGACCATATGGCCATAATCAAAAAGTACACATCAGGA  
AGGCAAGAGAAGAACCCCGCACTCAGAATGAAGTGGATGATGGCAATGAGATACCC  
AATTACAGCAGACAAGAGAATAATGGACATGATTCCAGAGAGGAATGAACAAGGA  
CAAACCCTCTGGAGCAAAACAAACGATGCTGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACC

TCTGGCCGTAACATGGTGGGAATAGGAATGGCCCAACAACAAGTACAGTTCATTACC  
CTAAGGTATATAAACTTATTTTCGAAAAGGTCGAAAGGTTGAAACATGGTACCTTCG  
GCCCTGTCCACTTCAGAAATCAAGTTAAAATAAGGAGGAGAGTTGATACAAACCCT  
GGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATTATGGAAGTTGTTTTTC  
CCAAATGAAGTGGGGGCAAGAATACTGACATCAGAGTCACAGCTGGCAATAACAAA  
AGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAGGATTGTAAAATTGCTCCCTTGATGGTGGCGTACA  
TGCTAGAAAGAGAAATTGGTCCGTAAAACAAGGTTTCTCCAGTAGCCGGCGGAACA  
GGCAGTGTTTATATTGAAGTGTTGCACTTAACCCAAGGGACGTGCTGGGAGCAGATG  
TACACTCCAGGAGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGACCAAAGTTTGATTATCGC  
TGCTAGAAACATAGTAAGAAGAGCAGCAGTGTCAGCAGACCCATTAGCATCTCTCTT  
GGAAATGTGCCACAGCACACAGATTGGAGGAGTAAGGATGGTGGACATCCTTAGAC  
AGAATCCAACCTGAGGAACAAGCCGTAGACATATGCAAGGCAGCAATAGGGTTGAGG  
ATTAGCTCATCTTTCAGTTTTGGTGGGTTCACTTTCAAAGGACAAGCGGATCATCA  
GTCAAGAAAGAAGAAGAAGTGCTAACGGGCAACCTCCAAACACTGAAAATAAGAG  
TACATGAAGGGTATGAAGAATTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATTCTC  
AGAAAGGCAACCAGGAGATTGATCCAGTTGATAGTAAGCGGGAGAGACGAGCAGT  
CAATTGCTGAGGCAATAATTGTGGCCATGGTATTCTCACAAGAGGATTGCATGATCA  
AGGCAGTTAGGGGCGATCTGAACTTTGTCAATAGGGCAAACCAGCGACTGAACCCC  
ATGCACCAACTCTTGAGGCATTTCCAAAAAGATGCAAAAAGTGCTTTTCCAGAACTGG  
GGAATTGAATCCATCGACAATGTGATGGGAATGATCGGAATACTGCCCCGACATGAC  
CCCAAGCACGGAGATGTCGCTGAGAGGGATAAGAGTCAGCAAAATGGGAGTAGAT  
GAATACTCCAGCAGGAGAGAGTGGTAGTGAGTATTGACCGATTTTAAAGGGTTAG  
AGATCAAAGAGGGGAACGTACTATTGTCTCCCGAAGAAGTCAGTGAAACGCAAGGAA  
CTGAGAAGTTGACAATAACTTATTCGTCATCAATGATGTGGGAGATCAATGGCCCTG  
AGTCAGTGCTAGTCAACACTTATCAATGGATAATCAGGAACTGGGAAATTGTGAAA  
ATTCAATGGTCACAAGATCCCACAATGTTATACAACAAAATGGAATTTGAACCATTT  
CAGTCTCTTGTCCCTAAGGCAACCAGAAGCCGGTACAGTGGATTCTGTAAGGACACTG  
TTCCAGCAAATGCGGGATGTGCTTGGGACATTTGACACTGTCCAAATAATAAACTT  
CTCCCCTTTGCTGCTGCTCCACCAGAACAGAGTAGGATGCAATTTTCCTCATTGACTG  
TGAATGTGAGAGGATCAGGGTTGAGGATACTGGTAAGAGGCAATTCTCCAGTATTC  
AATTACAACAAGGCAACCAACGACTTACAGTTCTTGGAAGGATGCAGGTGCATT  
GACTGAAGATCCAGATGAAGGCACATCTGGGGTGGAGTCTGCTGTCCTGAGAGGAT  
TTCTCATTTTGGGCAAGAAGACAAGAGATATGGCCCAGCATTAAAGCATCAATGAA  
CTGAGCAATCTTGCAAAAGGAGAGAAAGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGGGACGT  
AGTGTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAG  
CGACCAAAGAATTCCGGATGGCCATCAATTAGTGTCGAATTGTT

Segment 2—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 10)

TTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCCTAAAAATTCCAGCGCAAAATGCCAT  
AAGCACCATTCCTTATACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAG

GATACACCATGGACACAGTAAACAGAACACACCAATACTCAGAAAAGGGAAAGTG  
GACGACAAACACAGAGACTGGTGCACCCCAGCTCAACCCGATTGATGGACCACTAC  
CTGAGGATAATGAACCAAGTGGGTATGCACAAACAGACTGTGTTCTAGAGGCTATG  
GCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGAATATTTGAGAATTCATGCCTTGAAACAATG  
GAAGTTGTTCAACAAACAAGGGTAGATAAACTAACTCAAGGTCGCCAGACTTATGA  
TTGGACATTAAACAGAAATCAACCGGCAGCAACTGCATTGGCCAACACCATAGAAG  
TCTTTAGATCGAATGGCCTAACAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTTAA  
AGGATGTAATGGAATCAATGAACAAAGAGGAAATAGAGATAACAACCCACTTTCAA  
AGAAAAAGGAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAGATGGTCACGCAAAGAACAA  
TAGGGAAGAAAAAACAAGACTGAATAAGAGAGGCTATCTAATAAGAGCACTGAC  
ATTAATACGATGACCAAAGATGCAGAGAGAGGCAAGTTAAAAAGAAGGGCTATC  
GCAACACCTGGGATGCAGATTAGAGGTTTCGTATACTTTGTTGAAACTTTAGCTAGG  
AGCATTTGCGAAAAGCTTGAACAGTCTGGGCTCCAGTAGGGGGCAATGAAAAGAA  
GGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACACAGAGA  
TTTCTTTCACAATCACTGGGGACAACACTAAGTGGGAATGAAAATCAAAATCCTCGAA  
TGTTCTTGCGGATGATTACATATATCACCAGAAATCAACCCGAGTGGTTCAGAAACA  
TCCTGAGCATGGCACCCATAATGTTCTCAAACAAAATGGCAAGACTAGGGAAAGGG  
TACATGTTTCGAGAGTAAAAGAATGAAGATTCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCT  
AGCAAGCATTGACCTGAAGTACTTCAATGAATCAACAAAGAAGAAAATTGAGAAAA  
TAAGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCATCACTGAGTCCTGGGATGATGATGGGCA  
TGTTCAACATGCTAAGTACGGTCTTGGGAGTCTCGATACTGAATCTTGGACAAAAGA  
AATACACCAAGACAATATACTGGTGGGATGGGCTCCAATCATCCGACGATTTTGCTC  
TCATAGTGAATGCACCAAACCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGACAGATTCTAC  
AGGACCTGCAAGTTAGTGGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCCTATATAAATAA  
GACAGGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCTAATTTT  
AGCATGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGACATGAG  
TATTGGAGTAACAGTGATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGACCTGCAA  
CGGCCCAGATGGCTCTTCAATTGTTTCATCAAAGACTACAGATACACATATAGGTGCC  
ATAGGGGAGACACACAAATTCAGACGAGAAGATCATTGAGTTAAAGAAGCTGTGG  
GATCAAACCCAATCAAAGGTAGGGCTATTAGTATCAGATGGAGGACCAAACCTTATA  
CAATATACGGAATCTTCACATTCTGAGTCTGCTTAAAATGGGAGCTAATGGATGA  
TGATTATCGGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCCTTTGTCAGTCATAAAGAGAT  
TGATTCTGTAAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGA  
ATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCTGGATTCCCAAGAGGAATCGTTCTATTCT  
CAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCA  
ATCTATTCGAGAAATTTTCCCTAGCAGTTCATATAGGAGACCGGTTGGAATTTCTA  
GCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGGGTCGACTTCGAG  
TCTGGACGGATCAAGAAAGAAGAGTTCTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATT  
GAAGAACTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAACTTGTCTTCATGAAA

## Segment 3—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 11)

TCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCG  
GAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATCGAAACTAACAAGTTTG  
CTGCAATATGCACACATTTGGAAGTTTGTTTCATGTATTCGGATTTCCATTTTCATCGA  
CGAACGGGGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGTGACCCGAATGCACTATTGAAGC  
ACCGATTTGAGATAATTGAAGGAAGAGACCGAATCATGGCCTGGACAGTGGTGAAC  
AGTATATGTAACACAACAGGGGTAGAGAAGCCTAAATTTCTTCCTGATTTGTATGAT  
TACAAAGAGAACCGGTTTCATTGAAATTGGAGTAACACGGAGGGAAGTCCACATATA  
TTACCTAGAGAAAGCCAACAAAATAAAATCTGAGAAGACACACATTCACATCTTTTC  
ATTCCTGGAGAGGAGATGGCCACCAAGCGGACTACACCCTTGACGAAGAGAGCA  
GGGCAAGAATCAAACCTAGGCTTTTCACTATAAGACAAGAAATGGCCAGTAGGAGT  
CTATGGGATTCCTTTCGTCAGTCCGAAAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATT  
TGAGATTACAGGAAGTATGCGCAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCACCGAACTTCTC  
CAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTAGATGGATTTCGAGCCGAACGGCTGCATTGA  
GGGCAAGCTTTCCCAAATGTCAAAGAAGTGAACGCCAAAATTGAACCATTCTTGA  
GGACGACACCACGCCCCCTCAGATTGCCTGATGGGCCTCTTTGCCATCAGCGGTCAA  
AGTTCCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCGAGTCACGAGGGG  
GAGGGAATACCACTATATGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTCTTTGGCTGGAA  
AGAGCCTAACATAGTCAAACCACATGAGAAAGGCATAAATCCCAATTACCTCATGG  
CTTGGAAGCAGGTGCTAGCAGAGCTACAGGACATTGAAAATGAAGAGAAGATCCCA  
AGGACAAAGAACATGAAGAGAACAAAGCCAATTGAAGTGGGCACTCGGTGAAAATA  
TGGCACCAGAAAAAGTAGACTTTGATGACTGCAAAGATGTTGGAGACCTTAAACAG  
TATGACAGTGATGAGCCAGAGCCCAGATCTCTAGCAAGCTGGGTCCAAAATGAATT  
CAATAAGGCATGTGAATTGACTGATTCAAGCTGGATAGAACTTGATGAAATAGGAG  
AAGATGTTGCCCCGATTGAACATATCGCAAGCATGAGGAGGAACTATTTTACAGCA  
GAAGTGTCCCACTGCAGGGCTACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAATAC  
GGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAGCTGATCCCAATGAT  
AAGCAAATGTAGGACCAAAGAAGGAAGACGGAAAACAAACCTGTATGGGTTTCATTA  
TAAAAGGAAGGTCTCATTGAGAAATGATACTGATGTGGTGAACCTTTGTAAGTATGG  
AGTTCTCACTCACTGACCCGAGACTGGAGCCACACAAATGGGAAAAATACTGTGTTC  
TTGAAATAGGAGACATGCTCTTGAGGACTGCGATAGGCCAAGTGTGAGGCCCATG  
TTCCTATATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGCATGGA  
ACTGAGGCGCTGCCCTTCTTCAGTCTCTTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGA  
GTCTTCTGTCAAAGAGAAAGACATGACCAAGGAATTCTTTGAAAACAAATCGGAAA  
CATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAGGGGAGTGGAGGAAGGCTCTATTGGGAAAGTG  
TGCAGGACCTTACTGGCAAATCTGTATTCAACAGTCTATATGCGTCTCCACAACCTT  
GAGGGGTTTTTCGGCTGAATCGAGAAAATTGCTTCTCATTGTTCAAGGCACTTAGGGAC  
AACCTGGAACCTGGAACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATCGAGGAGTG  
CCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCATCTTGTTCAACTCCTTCCTCACA

CATGCACTGAAGTAGTTGTGGCAATGCTAC

Segment 4—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 12)

AAAAGCAACAAAAGATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACC  
GCAATGCAGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAACAATTCAACAGACACTGTA  
GACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGTAAACCTTCTAGAAGA  
CAAGCATAACGGGAACTATGCAAATAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTA  
AATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAG  
CAAGCTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACC  
CAGGAGATTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCAT  
TTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACA  
AAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTA  
ATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAAT  
GATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGCT  
GACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGTCATCAAGA  
TACAGCAAGAAGTTCAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAG  
AAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTC  
GAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTTCGCAATGGAAAGAAATGC  
TGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTTGTC  
GACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTTCAGAATATACATCCGATCAC  
AATTGGAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGAT  
TGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCA  
TTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAAT  
GAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGA  
GATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGT  
AGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTG  
ATGATGGTTTCCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATTGGAAA  
ATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTA  
AGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAATTTTA  
CCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGCAAAAATGGGACTTATGACTACC  
CAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCT  
GGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTCATT  
GGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCT  
ACAGTGTAGAATATGTATTTAACTTTAGGATTTTCAGAAGCAT

Segment 5—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 13)

ATCAATCACTGAGTGACATCGAAGCCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATAT  
GAACAAATGGGAGACTGGTGGGGAGCGCCAGGATGCCACAGAAATCAGAGCATCTGT  
CGGAAGAATGATTGGTGAATCGGGAGATTCTACATCCAAATGTGCACTGAACTCA  
AACTCAGTGATTATGATGGACGACTAATCCAGAATAGCATAACAATAGAGAGGATG

GTGCTTTCTGCTTTTGATGAGAGAAGAAATAAATACCTAGAAGAGCATCCCAGTGCT  
 GGAAGGACCCTAAGAAAACAGGAGGACCCATATATAGAAGAATAGACGGAAAGT  
 GGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAGAAGAAATAAGGAGAGTTTGGCGCCAA  
 GCAAACAATGGCGAAGATGCAACAGCAGGTCTTACTCATATCATGATTTGGCATTCC  
 AACCTGAATGATGCGACATATCAGAGAACAAGAGCGCTTGTTTCGCACCGGAATGGA  
 TCCCAGAATGTGCTCTCTAATGCAAGGTTCAACACTTCCCAGAAGGTCTGGTGCCGC  
 AGGTGCTGCGGTGAAAGGAGTTGGAACAATAGCAATGGAGTTAATCAGAATGATCA  
 AACGTGGAATCAATGACCGAAATTTCTGGAGGGGTGAAAATGGACGAAGGACAAG  
 GGTTGCTTATGAAAGAATGTGCAATATCCTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCTGCCCCA  
 GAGGGCAATGATGGATCAAGTAAGAGAAAGTCGAAACCCAGGAAACGCTGAGATT  
 GAAGACCTCATTTTTCTGGCACGGTCAGCACTCATTCTGAGGGGATCAGTTGCACAT  
 AAATCCTGCCTGCCTGCTTGTGTGTATGGGCTTGCAGTAGCAAGTGGGCATGACTTT  
 GAAAGGGAAGGGTACTCACTGGTCGGGATAGACCCATTCAAATTACTCCAAAACAG  
 CCAAGTGGTCAGCCTGATGAGACCAAATGAAAACCCAGCTCACAAGAGTCAATTGG  
 TGTGGATGGCATGCCACTCTGCTGCATTTGAAGATTTAAGAGTATCAAGTTTCATAA  
 GAGGAAAGAAAGTGATTCCAAGAGGAAAGCTTTCCACAAGAGGGGTCCAGATTGCT  
 TCAAATGAGAATGTGGAAACCATGGACTCCAATACCCTGGAATAAGAAGCAGATA  
 CTGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAATACCAATCAACAAAAGGCATCCGCA  
 GGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTTGAAAGA  
 GCAACCGTTATGGCAGCATTGAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATGCG  
 AACAGAAGTTATAAGAATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAAGATTTGTCCTTCCAGG  
 GGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCC  
 TTTGACATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGAC  
 AGTTGAGGAAAAATACCCTTGTTTCTACT

Segment 6—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 14)

ATGAATCCAAACCAAAGATAATAACCATTGGTTCGGTCTGTATGACGATTGGAATG  
 GCTAACTTAATATTACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATT  
 CAACTTGGGAATCAAATCAGATTGAAACATGCAATCAAAGCGTCATTACTTATGA  
 AAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTTAACATCAGCAACACCAACTTTGCTGC  
 TGGACAGTCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTCTGCCCTGTTAGT  
 GGATGGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTATAAGAATCGGTTCCAAGGGGGATGT  
 GTTTGTCATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGAATGCAGAACCTTCTTC  
 TTGACTCAAGGGGCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACAG  
 GAGCCCATATCGAACCCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAA  
 CTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTGTCATGATGGCATCAATTG  
 GCTAACAATTGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACA  
 ACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAA  
 GAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCA  
 AGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAA

ATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGA  
 TTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTG  
 GGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTT  
 CGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTA  
 ATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGTTGGATA  
 GGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAA  
 CGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAA  
 ATGAGTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTTTCAGCATCCAGAACTAACAGGGCTG  
 GATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAA  
 CACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTAACAGTGACACTGT  
 GGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTAA

Segment 7—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 15)

ATGAGTCTTCTAACCAGGTTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCC  
 CTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGTCTTTGCAGGAAAGAACACAGA  
 TCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTGTCACCTCTGACTAA  
 GGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCG  
 TAGACGCTTTGTCCA AAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGGATA  
 GAGCAGTTAACTATACAAGAAGCTCAAAGAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAG  
 GAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCCTTGCCAGTTGCATGGGCCTCATATAC  
 AACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGT  
 GAACAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCACCAAT  
 CCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAGGCTAT  
 GGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGAAAGGAGAAGACGTCCAAAAGCTGGCA  
 GAAGAGCTGCAAAGCAACATTGGAGTATTGAGATCTCTTGAGCAAGTCAAAGAG  
 TGGGGAAGGAATTGCAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAA  
 ATTCAGCTCTTGTGAAGAAATATCTATGCTCGAACCATTTAGATTCTTTCAATTTGT  
 TCTTTTATCTTATCAGCTCTCCATTTTCATGGCTTGGACAAGGCATTATCAAAAAGAG  
 GAGAGAAAAGAAAAGGTCCAAACAAAGAGACAAACAGAGAGGTATCAATTTGACA  
 CAGTTACCAAAAAGAAATCCAGGCCAAAGAAACAAAGGAAGTACTCTCTGACAACA  
 AGGGTGACCACAAGGGGCTTTCTGCCGGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGAC  
 TAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGG  
 TCTGAAAGATGACCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGC  
 AGATGCAGCGATTCAAGTCCTCTCGTCATTGCAGCAATATCATTGGGATCTTGCACC  
 TGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGCTTTAAATA  
 CGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAAT  
 ATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAG  
 AGCTAGAGTAA

Segment 8—VIRUS 2 (SEQ ID NO: 16)

AACATAATGGACTCCAAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCAT  
ATCCGCAAGCGATTTGCAGACAATGGATTGGGTGATGCCCCATTCCCTTGATCGGCTC  
CGCCGAGATCAAAAGTCCTTAAAAGGAAGAGGCAACACCCTTGGCCTCGATATCGA  
AACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATCGTGGAATGGATCTTGAAAGAGGAATCCA  
GCGAGACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGACA  
TGACCCTCGAGGAAATGTCACGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAAAAGATA  
ATAGGCCCTCTTTGCGTGCGATTGGACCAGGCGATCATGGAAAAGAACATAGTACT  
GAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTTAACCATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGGC  
TTTCACTGAGGAGGGAGCAATAGTTGGAGAAATTTACCATTACCTTCTCTTCCAGG  
ACATACTTATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATG  
GAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTCGCTTGGAGAACT  
GTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGA  
GCAATTGGGACAGAAATTTGAGGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACA  
GATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATAACATTTATGCAAGCCTTACAA  
CTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTTCGTTTCAGCTTATTTAACTG  
ATAA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabla 4. Secuencia del genoma del virus pAH1N1 con mutaciones en segmento de matriz (MA) (Virus 3)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Segment 1—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 17)<br><br>TATGGAGAGAATAAAAGAACTGAGAGATCTAATGTCGCAGTCCCGCACTCGCGAGA<br>TACTACTAAGACCACTGTGGACCATATGGCCATAATCAAAAAGTACACATCAGGA<br>AGGCAAGAGAAGAACCCCGCACTCAGAATGAAGTGGATGATGGCAATGAGATACCC<br>AATTACAGCAGACAAGAGAATAATGGACATGATTCCAGAGAGGAATGAACAAGGA<br>CAAACCCTCTGGAGCAAAACAAACGATGCTGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACC<br>TCTGGCCGTAACATGGTGGAAATAGGAATGGCCCAACAACAAGTACAGTTCATTACC<br>CTAAGGTATATAAACTTATTTGAAAAGGTCGAAAGGTTGAAACATGGTACCTTCG<br>GCCCTGTCCACTTCAGAAATCAAGTTAAAATAAGGAGGAGAGTTGATACAAACCCT<br>GGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATTATGGAAGTTGTTTTC<br>CCAAATGAAGTGGGGGCAAGAATACTGACATCAGAGTCACAGCTGGCAATAACAAA<br>AGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAGGATTGTAAAATTGCTCCCTTGATGGTGGCGTACA<br>TGCTAGAAAGAGAAATTGGTCCGTAAAACAAGGTTTCTCCAGTAGCCGGCGGAACA<br>GGCAGTGTTTATATTGAAGTGTTGCACTTAACCCAAGGGACGTGCTGGGAGCAGATG<br>TAACTCCAGGAGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGACCAAAGTTTGATTATCGC<br>TGCTAGAAACATAGTAAGAAGAGCAGCAGTGTCAGCAGACCCATTAGCATCTCTCTT<br>GGAAATGTGCCACAGCACACAGATTGGAGGAGTAAGGATGGTGGACATCCTTAGAC |

AGAATCCAACCTGAGGAACAAGCCGTAGACATATGCAAGGCAGCAATAGGGTTGAGG  
ATTAGCTCATCTTTCAGTTTTGGTGGGTTCACTTTCAAAGGACAAGCGGATCATCA  
GTCAAGAAAGAAGAAGAAGTGCTAACGGGCAACCTCCAAACACTGAAAATAAGAG  
TACATGAAGGGTATGAAGAATTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATTCTC  
AGAAAGGCAACCAGGAGATTGATCCAGTTGATAGTAAGCGGGAGAGACGAGCAGT  
CAATTGCTGAGGCAATAATTGTGGCCATGGTATTCTCACAAGAGGATTGCATGATCA  
AGGCAGTTAGGGGCGATCTGAACTTTGTCAATAGGGCAAACCAGCGACTGAACCCC  
ATGCACCAACTCTTGAGGCATTTCCAAAAAGATGCAAAAGTGCTTTTCCAGAACTGG  
GGAATTGAATCCATCGACAATGTGATGGGAATGATCGGAATACTGCCCCGACATGAC  
CCCAAGCACGGAGATGTGCTGAGAGGGATAAGAGTCAGCAAAATGGGAGTAGAT  
GAATACTCCAGCACGGAGAGAGTGGTAGTGAGTATTGACCGATTTTAAAGGGTTAG  
AGATCAAAGAGGGAACGTACTATTGTCTCCCGAAGAAGTCAGTGAAACGCAAGGAA  
CTGAGAAGTTGACAATAACTTATTCGTCATCAATGATGTGGGAGATCAATGGCCCTG  
AGTCAGTGCTAGTCAACACTTATCAATGGATAATCAGGAACTGGGAAATTGTGAAA  
ATTCAATGGTCACAAGATCCCACAATGTTATACAACAAAATGGAATTTGAACCATTT  
CAGTCTCTTGTCCCTAAGGCAACCAGAAGCCGGTACAGTGGATTCTGTAAGGACACTG  
TTCCAGCAAATGCGGGATGTGCTTGGGACATTTGACACTGTCCAAATAATAAACTT  
CTCCCCTTTGCTGCTGCTCCACCAGAACAGAGTAGGATGCAATTTTCCTCATTGACTG  
TGAATGTGAGAGGATCAGGGTTGAGGATACTGGTAAGAGGCAATTCTCCAGTATTC  
AATTACAACAAGGCAACCAAACGACTTACAGTTCTTGGAAGGATGCAGGTGCATT  
GACTGAAGATCCAGATGAAGGCACATCTGGGGTGGAGTCTGCTGCTCCTGAGAGGAT  
TTCTCATTTTGGGCAAGAAGACAAGAGATATGGCCCAGCATTAAAGCATCAATGAA  
CTGAGCAATCTTGCAAAAGGAGAGAAAGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGGGACGT  
AGTGTGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAG  
CGACCAAAGAATTCCGGATGGCCATCAATTAGTGTCGAATTGTT

Segment 2—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 18) :

TTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCCTAAAAATTCAGCGCAAAATGCCAT  
AAGCACCACATTCCCTTATACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAG  
GATACACCATGGACACAGTAAACAGAACACACCAATACTCAGAAAAGGGAAAGTG  
GACGACAAACACAGAGACTGGTGCACCCCAGCTCAACCCGATTGATGGACCACTAC  
CTGAGGATAATGAACCAAGTGGGTATGCACAAACAGACTGTGTTCTAGAGGCTATG  
GCTTTCCTTGAAGAAATCCCACCCAGGAATATTTGAGAATTCATGCCTTGAAACAATG  
GAAGTTGTTCAACAACAAGGGTAGATAAACTAACTCAAGGTGCGCAGACTTATGA  
TTGGACATTAAACAGAAATCAACCGGCAGCAACTGCATTGGCCAACACCATAGAAG  
TCTTTAGATCGAATGGCCTAACAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTTAA  
AGGATGTAATGGAATCAATGAACAAAGAGGAAATAGAGATAACAACCCACTTTCAA  
AGAAAAAGGAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAGATGGTCACGCAAAGAACAA  
TAGGGAAGAAAAAACAAGACTGAATAAGAGAGGCTATCTAATAAGAGCACTGAC  
ATTAAATACGATGACCAAAGATGCAGAGAGAGGCAAGTTAAAAAGAAGGGCTATC  
GCAACACCTGGGATGCAGATTAGAGGTTTCGTATACTTTGTTGAAACTTTAGCTAGG

AGCATTTGCGAAAAGCTTGAACAGTCTGGGCTCCCAGTAGGGGGCAATGAAAAGAA  
GGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACACAGAGA  
TTTCTTTCACAATCACTGGGGACAACACTAAGTGGAATGAAAATCAAAATCCTCGAA  
TGTTCTTGGCGATGATTACATATATCACCAGAAATCAACCCGAGTGGTTCAGAAACA  
TCCTGAGCATGGCACCCATAATGTTCTCAAACAAAATGGCAAGACTAGGGAAAGGG  
TACATGTTTCGAGAGTAAAAGAATGAAGATTCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCT  
AGCAAGCATTGACCTGAAGTACTTCAATGAATCAACAAAGAAGAAAATTGAGAAAA  
TAAGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCATCACTGAGTCCTGGGATGATGATGGGCA  
TGTTCAACATGCTAAGTACGGTCTTGGGAGTCTCGATACTGAATCTTGGACAAAAGA  
AATACACCAAGACAATATACTGGTGGGATGGGCTCCAATCATCCGACGATTTTGCTC  
TCATAGTGAATGCACCAAACCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGACAGATTCTAC  
AGGACCTGCAAGTTAGTGGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCCTATATAAATAA  
GACAGGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCTAATTTT  
AGCATGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGACATGAG  
TATTGGAGTAACAGTGATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGACCTGCAA  
CGGCCCAGATGGCTCTTCAATTGTTTCATCAAAGACTACAGATACACATATAGGTGCC  
ATAGGGGAGACACACAAATTCAGACGAGAAGATCATTTGAGTTAAAGAAGCTGTGG  
GATCAAACCCAATCAAAGGTAGGGCTATTAGTATCAGATGGAGGACCAAACCTTATA  
CAATATACGGAATCTTCACATTCCTGAAGTCTGCTTAAATGGGAGCTAATGGATGA  
TGATTATCGGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCCCTTTGTCAGTCATAAAGAGAT  
TGATTCTGTAAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGA  
ATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCTGGATTCCCAAGAGGAATCGTTCTATTCT  
CAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCA  
ATCTATTCGAGAAATTTTCCCTAGCAGTTCATATAGGAGACCGGTTGGAATTTCTA  
GCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGGGTCGACTTCGAG  
TCTGGACGGATCAAGAAAGAAGAGTTCTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATT  
GAAGAACTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAACTTGTCTTCATGAAA

Segment 3—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 19)

TCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCG  
GAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATCGAAACTAACAAGTTTG  
CTGCAATATGCACACATTTGGAAGTTTGTTCATGTATTCGGATTTCCATTTTCATCGA  
CGAACGGGGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGTGACCCGAATGCACTATTGAAGC  
ACCGATTTGAGATAATTGAAGGAAGAGACCGAATCATGGCCTGGACAGTGGTGAAC  
AGTATATGTAACACAACAGGGGTAGAGAAGCCTAAATTTCTTCCTGATTTGTATGAT  
TACAAAGAGAACCGGTTTCATTGAAATTGGAGTAACACGGAGGGAAGTCCACATATA  
TTACCTAGAGAAAGCCAACAAAATAAAATCTGAGAAGACACACATTCACATCTTTTC  
ATTCATGGAGAGGAGATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCTTGACGAAGAGAGCA  
GGGCAAGAATCAAACACTAGGCTTTTCACTATAAGACAAGAAATGGCCAGTAGGAGT  
CTATGGGATTCTTTTCGTAGTCCGAAAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATT  
TGAGATTACAGGAACATATGCGCAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCACCGAAGTTCTC

CAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTAGATGGATTTCGAGCCGAACGGCTGCATTGA  
 GGGCAAGCTTTCCCAAAATGTCAAAAGAAGTGAACGCCAAAATTGAACCATTCTTGA  
 GGACGACACCACGCCCCCTCAGATTGCCTGATGGGCCTCTTTGCCATCAGCGGTCAA  
 AGTTCCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCGAGTCACGAGGGG  
 GAGGGAATACCACTATATGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTCTTTGGCTGGAA  
 AGAGCCTAACATAGTCAAACCACATGAGAAAGGCATAAATCCCAATTACCTCATGG  
 CTTGGAAGCAGGTGCTAGCAGAGCTACAGGACATTGAAAATGAAGAGAAGATCCCA  
 AGGACAAAGAACATGAAGAGAACAAGCCAATTGAAGTGGGCACTCGGTGAAAATA  
 TGGCACCAGAAAAAGTAGACTTTGATGACTGCAAAGATGTTGGAGACCTTAAACAG  
 TATGACAGTGATGAGCCAGAGCCCAGATCTCTAGCAAGCTGGGTCCAAAATGAATT  
 CAATAAGGCATGTGAATTGACTGATTCAAGCTGGATAGAAGTTGATGAAATAGGAG  
 AAGATGTTGCCCGATTGAACATATCGCAAGCATGAGGAGGAACTATTTTACAGCA  
 GAAGTGTCCCACTGCAGGGCTACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAATAC  
 GGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAGCTGATCCCAATGAT  
 AAGCAAATGTAGGACCAAAGAAGGAAGACGGAAAAACAAACCTGTATGGGTTTCATTA  
 TAAAAGGAAGGTCTCATTGAGAAATGATACTGATGTGGTGAACTTTGTAAAGTATGG  
 AGTTCTCACTCACTGACCCGAGACTGGAGCCACACAAATGGGAAAAATACTGTGTTT  
 TTGAAATAGGAGACATGCTCTTGAGGACTGCGATAGGCCAAGTGTGAGGCCCATG  
 TTCCTATATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGCATGGA  
 ACTGAGGCGCTGCCTTCTTCAGTCTCTTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGA  
 GTCTTCTGTCAAAGAGAAAGACATGACCAAGGAATTCTTTGAAAACAAATCGGAAA  
 CATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAGGGGAGTGGAGGAAGGCTCTATTGGGAAAAGTG  
 TGCAGGACCTTACTGGCAAAATCTGTATTCAACAGTCTATATGCGTCTCCACAACCTT  
 GAGGGGTTTTCGGCTGAATCGAGAAAATTGCTTCTCATTGTTTCAGGCACTTAGGGAC  
 AACCTGGAACCTGGAACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATCGAGGAGTG  
 CCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCATCTTGTTCAACTCCTCCTCACA  
 CATGCACTGAAGTAGTTGTGGCAATGCTAC

Segment 4—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 20)

AAAAGCAACAAAAGATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACC  
 GCAATGCAGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAAACAATTCAACAGACACTGTA  
 GACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGTAAACCTTCTAGAAGA  
 CAAGCATAACGGGAAACTATGCAAATAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTA  
 AATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAG  
 CAAGCTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACC  
 CAGGAGATTTTCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCAT  
 TTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACA  
 AAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTA  
 ATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAAT  
 GATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGCT  
 GACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGTCATCAAGA

TACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAG  
AAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTC  
GAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGC  
TGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTTGTC  
GACACCCAAGGGTGTATAAACACCAGCCTCCCATTTTCAGAATATACATCCGATCAC  
AATTGGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGAT  
TGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCA  
TTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAAT  
GAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGA  
GATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGT  
AGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTG  
ATGATGGTTTCCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATTGGAAA  
ATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTA  
AGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAATTTA  
CCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACC  
CAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCT  
GGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCCCGAGTTCATT  
GGTACTGGTAGTCTCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCT  
ACAGTGTAGAATATGTATTTAACTTTAGGATTTCAGAAGCAT

Segment 5—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 21).

ATCAATCACTGAGTGACATCGAAGCCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATAT  
GAACAAATGGAGACTGGTGGGGAGCGCCAGGATGCCACAGAAATCAGAGCATCTGT  
CGGAAGAATGATTGGTGGAAATCGGGAGATTCTACATCCAAATGTGCACTGAACTCA  
AACTCAGTGATTATGATGGACGACTAATCCAGAATAGCATAACAATAGAGAGGATG  
GTGCTTTCTGCTTTTGATGAGAGAAGAAATAAATACCTAGAAGAGCATCCCAGTGCT  
GGGAAGGACCCTAAGAAAACAGGAGGACCCATATATAGAAGAATAGACGGAAAGT  
GGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAGAAGAAATAAGGAGAGTTTGGCGCCAA  
GCAACAATGGCGAAGATGCAACAGCAGGTCTTACTCATATCATGATTTGGCATTCC  
AACCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAGAGCGCTTGTTTCGCACCGGAATGGA  
TCCCAGAATGTGCTCTCTAATGCAAGGTTCAACACTTCCCAGAAGGTCTGGTGCCGC  
AGGTGCTCGGTTGAAAGGAGTTGGAACAATAGCAATGGAGTTAATCAGAATGATCA  
AACGTGGAATCAATGACCGAAATTTCTGGAGGGGTGAAAATGGACGAAGGACAAG  
GGTTGCTTATGAAAGAATGTGCAATATCCTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCTGCCCA  
GAGGGCAATGATGGATCAAGTAAGAGAAAGTCGAAACCCAGGAAACGCTGAGATT  
GAAGACCTCATTTTCTGGCACGGTCAGCACTCATTCTGAGGGGATCAGTTGCACAT  
AAATCCTGCCTGCCTGCTTGTGTGTATGGGCTTGCAGTAGCAAGTGGGCATGACTTT  
GAAAGGGAAGGGTACTACTGGTCGGGATAGACCCATTCAAATTACTCCAAAACAG  
CCAAGTGGTCAGCCTGATGAGACCAAATGAAAACCCAGCTCACAAGAGTCAATTGG  
TGTGGATGGCATGCCACTCTGCTGCATTTGAAGATTTAAGAGTATCAAGTTTCATAA  
GAGGAAAGAAAGTGATTCCAAGAGGAAAGCTTTCCACAAGAGGGGTCCAGATTGCT

TCAAATGAGAATGTGGAAACCATGGACTCCAATACCCTGGAACTAAGAAGCAGATA  
CTGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAATACCAATCAACAAAAGGCATCCGCA  
GGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTTGAAAGA  
GCAACCGTTATGGCAGCATTTCAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATGCG  
AACAGAAGTTATAAGAATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAAGATTTGTCCTTCCAGG  
GGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCC  
TTTGACATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGAC  
AGTTGAGGAAAAATACCCTTGTTTCTACT

Segment 6—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 22)

TGATGAATCCAAACCAAAAGATAATAACCATTGGTTTCGGTCTGTATGACAATTGGAA  
TGGCTAACTTAATGTTACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAA  
TTCAACTTGGGAATCAAAATCAGATTGAAACATGCAATCAAAGCGTCATTACTTATG  
AAAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTTAACATCAGCAACACCAACTTTGCTG  
CTGGACAGTCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTCTGCCCTGTTA  
GTGGATGGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTGTAAAGAATCGGTTCCAAGGGGGAT  
GTGTTTGTCTATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGAATGCAGAACCTTC  
TTCTTGACTCAAGGGGCCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGAC  
AGGAGCCCATATCGAACCCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCTCTCCATAC  
AACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTCTATGATGGCATCAAT  
TGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTAC  
AACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACA  
AGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACC  
AAGTAATGAACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCA  
AATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTG  
ATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGT  
GGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTT  
TCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTA  
ATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTTTGGATA  
GGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAGATGATTGGGATCCGAA  
CGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAA  
ATGAGTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTTCAGCATCCAGAACTAACAGGGCTG  
GATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAA  
CACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTAAACAGTGACACTGT  
GGGTGTTGCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTAACA

Segment 7—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 23)

ATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCC  
CTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGTCTTTGCAGGAAAGAACACAGA  
TCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTGTACCTCTGACTAA  
GGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCG

TAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGGATA  
GAGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTCAAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAG  
GAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCACCTGCCAGTTGCATGGGCCTCATATAC  
AACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGT  
GAACAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCACCAAT  
CCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAGGCTAT  
GGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGAAAGGAGAAGACGTCCAAAAGCTGGCA  
GAAGAGCTGCAAAGCAACATTGGAGTATTGAGATCTCTTGGAGCAAGTCAAAAGAG  
TGGGGAAGGAATTGCAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAA  
ATTCAGCTCTTGTGAAGAAATATCTATGCTCGAACCATTTCAGATTCTTTCAATTTGT  
TCTTTTATCTTATCAGCTCTCCATTTTCATGGCTTGGACAAGGCATTATCAAAAAAGAG  
GAGAGAAAAGAAAAGGTCCAAACAAAGAGACAAACAGAGAGGTATCAATTTGACA  
CAGTTACCAAAAAGAAATCCAGGCCAAAGAAACAAAGGAAGTACTCTCTGACAACA  
AGGGTGACCACAAGGGGCTTTCTGCCGGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGAC  
TAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGG  
TCTGAAAGATGACCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGC  
AGATGCAGCGATTCAAGTCCTCTCGTCATTGCAGCAATATCATTGGGATCTTGCACC  
TGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGCTTTAAATA  
CGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAAT  
ATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAG  
AGCTAGAGTAA

Segment 8—VIRUS 3 (SEQ ID NO: 24)

AACATAATGGACTCCAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCAT  
ATCCGCAAGCGATTTGCAGACAATGGATTGGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTC  
CGCCGAGATCAAAAGTCCTTAAAAGGAAGAGGGCAACACCCTTGGCCTCGATATCGA  
AACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATCGTGGAATGGATCTTGAAAGAGGAATCCA  
GCGAGACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGACA  
TGACCCTCGAGGAAATGTACAGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAAAAGATA  
ATAGGCCCTCTTTGCGTGCGATTGGACCAGGCGATCATGGAAAAGAACATAGTACT  
GAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGGC  
TTTCACTGAGGAGGGAGCAATAGTTGGAGAAATTTACCATTACCTTCTCTTCCAGG  
ACATACTTATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATG  
GAATGGTAACACGGTTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTTCGCTTGGAGAACT  
GTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGA  
GCAATTGGGACAGAAATTTGAGGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACA  
GATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTTCGAACAAATAACATTTATGCAAGCCTTACAA  
CTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAACTG  
ATAA

Tabla 5. Secuencia del genoma del virus pAH1N1 con mutaciones en segmento NA (Virus 4)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Segment 1—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 25)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| TATGGAGAGAATAAAAGAACTGAGAGATCTAATGTTCGCAGTCCCGCACTCGCGAGA<br>TACTACTAAGACCACTGTGGACCATATGGCCATAATCAAAAAGTACACATCAGGA<br>AGGCAAGAGAAGAACCCCGCACTCAGAATGAAGTGGATGATGGCAATGAGATACCC<br>AATTACAGCAGACAAGAGAATAATGGACATGATTCCAGAGAGGAATGAACAAGGA<br>CAAACCTCTGGAGCAAAACAAACGATGCTGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACC<br>TCTGGCCGTAACATGGTGGAAATAGGAATGGCCCAACAACAAGTACAGTTCATTACC<br>CTAAGGTATATAAACTTATTTTCGAAAAGGTTCGAAAGGTTGAAACATGGTACCTTCG<br>GCCCTGTCCACTTCAGAAATCAAGTTAAAATAAGGAGGAGAGTTGATACAAACCCT<br>GGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATTATGGAAGTTGTTTTT<br>CCAAATGAAGTGGGGGCAAGAATACTGACATCAGAGTCACAGCTGGCAATAACAAA<br>AGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAGGATTGTAAAATTGCTCCCTTGATGGTGGCGTACA<br>TGCTAGAAAGAGAATTGGTCCGTAAAACAAGGTTTCTCCCAGTAGCCGGCGGAACA<br>GGCAGTGTTTATATTGAAGTGTTGCACTTAACCCAAGGGACGTGCTGGGAGCAGATG<br>TACTCTCCAGGAGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGACCAAAGTTTGATTATCGC<br>TGCTAGAAACATAGTAAGAAGAGCAGCAGTGTCAGCAGACCCATTAGCATCTCTCTT<br>GGAAATGTGCCACAGCACACAGATTGGAGGAGTAAGGATGGTGGACATCCTTAGAC<br>AGAATCCAACCTGAGGAACAAGCCGTAGACATATGCAAGGCAGCAATAGGGTTGAGG<br>ATTAGCTCATCTTTCAAGTTTGGTGGGTTCACTTTCAAAAGGACAAGCGGATCATCA<br>GTCAAGAAAGAAGAAGAAGTGCTAACGGGCAACCTCCAAACACTGAAAATAAGAG<br>TACATGAAGGGTATGAAGAATTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATTCTC<br>AGAAAGGCAACCAGGAGATTGATCCAGTTGATAGTAAGCGGGAGAGACGAGCAGT<br>CAATTGCTGAGGCAATAATTGTGGCCATGGTATTCTCACAAGAGGATTGCATGATCA<br>AGGCAGTTAGGGGGCGATCTGAACCTTTGTCAATAGGGCAAACCAGCGACTGAACCCC<br>ATGCACCAACTCTTGAGGCATTTCCAAAAGATGCAAAAGTGCTTTTCCAGAACTGG<br>GGAATTGAATCCATCGACAATGTGATGGGAATGATCGGAATACTGCCCCGACATGAC<br>CCCAAGCACGGAGATGTCGCTGAGAGGGATAAGAGTCAGCAAAATGGGAGTAGAT<br>GAATACTCCAGCACGGAGAGAGTGGTAGTGAGTATTGACCGATTTTTTAAGGGTTAG<br>AGATCAAAGAGGGGAACGTACTATTGTCTCCCGAAGAAGTCAGTGAAACGCAAGGAA<br>CTGAGAAGTTGACAATAACTTATTCGTCATCAATGATGTGGGAGATCAATGGCCCTG<br>AGTCAGTGCTAGTCAACACTTATCAATGGATAATCAGGAACTGGGAAATTGTGAAA<br>ATTCAATGGTCACAAGATCCCACAATGTTATACAACAAAATGGAATTTGAACCATTT<br>CAGTCTCTTGTCCCTAAGGCAACCAGAAGCCGGTACAGTGGATTTCGTAAGGACACTG<br>TTCCAGCAAATGCGGGATGTGCTTGGGACATTTGACACTGTCCAAATAATAAACTT<br>CTCCCCTTTGCTGCTGCTCCACCAGAACAGAGTAGGATGCAATTTTCCTCATTGACTG<br>TGAATGTGAGAGGATCAGGGTTGAGGATACTGGTAAGAGGGCAATTCTCCAGTATTC<br>AATTACAACAAGGCAACCAAACGACTTACAGTTCCTTGGAAGGATGCAGGTGCATT<br>GACTGAAGATCCAGATGAAGGCACATCTGGGGTGGAGTCTGCTGTCCTGAGAGGAT |

TTCTCATTTTGGGCAAAGAAGACAAGAGATATGGCCCAGCATTAAGCATCAATGAA  
CTGAGCAATCTTGCAAAAGGAGAGAAAGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGGGACGT  
AGTGTTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAG  
CGACCAAAGAATTCCGGATGGCCATCAATTAGTGTCGAATTGTT

Segment 2—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 26)

TTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCCTAAAAATTCCAGCGCAAAATGCCAT  
AAGCACCATTTCCCTTATACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAG  
GATACACCATGGACACAGTAAACAGAACACACCAATACTCAGAAAAGGGAAAGTG  
GACGACAAACACAGAGACTGGTGCACCCCAGCTCAACCCGATTGATGGACCACTAC  
CTGAGGATAATGAACCAAGTGGGTATGCACAAACAGACTGTGTTCTAGAGGCTATG  
GCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGAATATTTGAGAATTCATGCCTTGAAACAATG  
GAAGTTGTTCAACAAACAAGGGTAGATAAACTAACTCAAGGTCGCCAGACTTATGA  
TTGGACATTAAACAGAAATCAACCGGCAGCAACTGCATTGGCCAACACCATAGAAG  
TCTTTAGATCGAATGGCCTAACAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTTAA  
AGGATGTAATGGAATCAATGAACAAAGAGGAAATAGAGATAACAACCCACTTTCAA  
AGAAAAAGGAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAGATGGTCACGCAAAGAACAA  
TAGGGAAGAAAAAACAAGACTGAATAAGAGAGGCTATCTAATAAGAGCACTGAC  
ATTAATAACGATGACCAAAGATGCAGAGAGAGGCAAGTTAAAAAGAAGGGCTATC  
GCAACACCTGGGATGCAGATTAGAGGTTTTCGTATACTTTGTTGAACTTTAGCTAGG  
AGCATTTGCGAAAAGCTTGAACAGTCTGGGCTCCCAGTAGGGGGCAATGAAAAGAA  
GGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACACAGAGA  
TTTCTTTCACAATCACTGGGGACAACACTAAGTGGAATGAAAATCAAAATCCTCGAA  
TGTTCTCGCGATGATTACATATATCACCAGAAATCAACCCGAGTGGTTCAGAAACA  
TCCTGAGCATGGCACCCATAATGTTCTCAAACAAAATGGCAAGACTAGGGAAAGGG  
TACATGTTTCGAGAGTAAAAGAATGAAGATTCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCT  
AGCAAGCATTGACCTGAAGTACTTCAATGAATCAACAAAGAAGAAAATTGAGAAAA  
TAAGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCATCACTGAGTCCTGGGATGATGATGGGCA  
TGTTCAACATGCTAAGTACGGTCTTGGGAGTCTCGATACTGAATCTTGGACAAAAGA  
AATACACCAAGACAATATACTGGTGGGATGGGCTCCAATCATCCGACGATTTTGCTC  
TCATAGTGAATGCACCAAACCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGACAGATTCTAC  
AGGACCTGCAAGTTAGTGGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCCTATATAAATAA  
GACAGGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCTAATTTT  
AGCATGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGACATGAG  
TATTGGAGTAACAGTGATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGACCTGCAA  
CGGCCCAGATGGCTCTTCAATTGTTTCATCAAAGACTACAGATACACATATAGGTGCC  
ATAGGGGAGACACACAAATTCAGACGAGAAGATCATTGAGTTAAAGAAGCTGTGG  
GATCAAACCCAATCAAAGGTAGGGCTATTAGTATCAGATGGAGGACCAAACCTTATA  
CAATATACGGAATCTTCACATTCCTGAAGTCTGCTTAAAATGGGAGCTAATGGATGA  
TGATTATCGGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCCTTTGTCAGTCATAAAGAGAT

TGATTCTGTAAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGA  
ATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCCTGGATTCCCAAGAGGAATCGTTCTATTCT  
CAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGCTGCA  
ATCTATTTCGAGAAATTTTCCCTAGCAGTTCATATAGGAGACCGGTTGGAATTTCTA  
GCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGGGTCGACTTCGAG  
TCTGGACGGATCAAGAAAGAAGAGTTCTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATT  
GAAGAACTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAACTTGTCTTCATGAAA

Segment 3—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 27)

TCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCG  
GAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAAATCGAAACTAACAAGTTTG  
CTGCAATATGCACACATTTGGAAGTTTGTTTCATGTATTCCGATTTCCATTTTCATCGA  
CGAACGGGGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGTGACCCGAATGCACTATTGAAGC  
ACCGATTTGAGATAATTGAAGGAAGAGACCGAATCATGGCCTGGACAGTGGTGAAC  
AGTATATGTAACACAACAGGGGTAGAGAAGCCTAAATTTCTTCCTGATTTGTATGAT  
TACAAAGAGAACCGGTTTCATTGAAATTGGAGTAACACGGAGGGAAGTCCACATATA  
TTACCTAGAGAAAAGCCAACAAAATAAAAATCTGAGAAGACACACATTCACATCTTTTC  
ATTCACTGGAGAGGAGATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCTTGACGAAGAGAGCA  
GGGCAAGAATCAAACACTAGGCTTTTCACTATAAGACAAGAAATGGCCAGTAGGAGT  
CTATGGGATTCCTTTCGTCAGTCCGAAAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATT  
TGAGATTACAGGAAGTATGCGCAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCACCGAAGTCTC  
CAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTAGATGGATTTCGAGCCGAACGGCTGCATTGA  
GGGCAAGCTTTCCCAAATGTCAAAGAAGTGAACGCCAAAATTGAACCATTCTTGA  
GGACGACACCACGCCCCCTCAGATTGCCTGATGGGCCTCTTTGCCATCAGCGGTCAA  
AGTTCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCGAGTCACGAGGGG  
GAGGGAATACCACTATATGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTCTTTGGCTGGAA  
AGAGCCTAACATAGTCAAACCACATGAGAAAGGCATAAATCCCAATTACCTCATGG  
CTTGAAGCAGGTGCTAGCAGAGCTACAGGACATTGAAAATGAAGAGAAGATCCCA  
AGGACAAAGAACATGAAGAGAACAAGCCAATTGAAGTGGGCACTCGGTGAAAATA  
TGGCACCAGAAAAAGTAGACTTTGATGACTGCAAAGATGTTGGAGACCTTAAACAG  
TATGACAGTGATGAGCCAGAGCCCAGATCTCTAGCAAGCTGGGTCCAAAATGAATT  
CAATAAGGCATGTGAATTGACTGATTCAAGCTGGATAGAAGTTCATGAAATAGGAG  
AAGATGTTGCCCGATTGAACATATCGCAAGCATGAGGAGGAAGTATTTTACAGCA  
GAAGTGTTCCCACTGCAGGGCTACTGAATACATAATGAAGGGAGTGACATAAATAC  
GGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAGCTGATCCCAATGAT  
AAGCAAATGTAGGACCAAAGAAGGAAGACGGAAAACAAACCTGTATGGGTTCATTA  
TAAAAGGAAGGTCTCATTTGAGAAATGATACTGATGTGGTGAAGTTTGTAAGTATGG  
AGTTCTCACTCACTGACCCGAGACTGGAGCCACACAAATGGGAAAAATACTGTGTTT  
TTGAAATAGGAGACATGCTCTTGAGGACTGCGATAGGCCAAGTGTTCGAGGCCCATG  
TTCCTATATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGCATGGA

ACTGAGGCGCTGCCTTCTTCAGTCTCTTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGA  
GTCTTCTGTCAAAGAGAAAGACATGACCAAGGAATTCTTTGAAAACAAATCGGAAA  
CATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAGGGGAGTGGAGGAAGGCTCTATTGGGAAAGTG  
TGCAGGACCTTACTGGCAAATCTGTATTCAACAGTCTATATGCGTCTCCACAACCTT  
GAGGGGTTTTTCGGCTGAATCGAGAAAATTGCTTCTCATTGTTCAAGGCACTTAGGGAC  
AACCTGGAACCTGGAACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATCGAGGAGTG  
CCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCATCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACA  
CATGCACTGAAGTAGTTGTGGCAATGCTAC

Segment 4—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 28)

AAAAGCAACAAAAGATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACC  
GCAAATGCAGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAACAATTCAACAGACACTGTA  
GACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGTAAACCTTCTAGAAGA  
CAAGCATAACGGGAAACTATGCAAATAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTA  
AATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAG  
CAAGCTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACC  
CAGGAGATTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCAT  
TTGAAAGGTTTGAGATATCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACA  
AAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTA  
ATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAAT  
GATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGCT  
GACCAACAAAGTCTCTATCAGAAATGCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGTCATCAAGA  
TACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAG  
AAGGGAGAATGAAGTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTC  
GAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTGCAATGGAAAGAAATGC  
TGGATCTGGTATTATCATTTAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTTGTC  
GACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTTCAAGATATACATCCGATCAC  
AATTGGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGAT  
TGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCA  
TTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAT  
GAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGA  
GATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGT  
AGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTG  
ATGATGGTTTTCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATTGGAAA  
ATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTA  
AGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAATTTA  
CCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACC  
CAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCT  
GGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCCAGTTCATT  
GGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCT

ACAGTGTAGAATATGTATTAACTTTAGGATTTTCAGAAGCAT

Segment 5—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 29)

ATCAATCACTGAGTGACATCGAAGCCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATAT  
GAACAAATGGGAGACTGGTGGGGAGCGCCAGGATGCCACAGAAATCAGAGCATCTGT  
CGGAAGAATGATTGGTGGGAATCGGGAGATTCTACATCCAAATGTGCACTGAACTCA  
AACTCAGTGATTATGATGGACGACTAATCCAGAATAGCATAACAATAGAGAGGATG  
GTGCTTTCTGCTTTTGTATGAGAGAAGAAATAAATACCTAGAAGAGCATCCCAGTGCT  
GGGAAGGACCTTAAGAAAACAGGAGGACCCATATATAGAAGAATAGACGGAAAGT  
GGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAGAAGAAATAAGGAGAGTTTGGCGCCAA  
GCAAACAATGGCGAAGATGCAACAGCAGGTCTTACTCATATCATGATTTGGCATTCC  
AACCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAGAGCGCTTGTTTCGCACCGGAATGGA  
TCCCAGAATGTGCTCTCTAATGCAAGGTTCAACACTTCCCAGAAGGTCTGGTGCCGC  
AGGTGCTGCGGTGAAGGAGTTGGAACAATAGCAATGGAGTTAATCAGAATGATCA  
AACGTGGAATCAATGACCGAAATTTCTGGAGGGGTGAAAATGGACGAAGGACAAG  
GGTTGCTTATGAAAGAATGTGCAATATCCTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCTGCCCCA  
GAGGGCAATGATGGATCAAGTAAGAGAAAGTCGAAACCCAGGAAACGCTGAGATT  
GAAGACCTCATTTTCTGGCACGGTCAGCACTCATTCTGAGGGGATCAGTTGCACAT  
AAATCCTGCCTGCCTGCTTGTGTGTATGGGCTTGCAGTAGCAAGTGGGCATGACTTT  
GAAAGGGAAGGGTACTCACTGGTCGGGATAGACCCATTCAAATTACTCCAAAACAG  
CCAAGTGGTCAGCCTGATGAGACCAAATGAAAACCCAGCTCACAAGAGTCAATTGG  
TGTGGATGGCATGCCACTCTGCTGCATTTGAAGATTAAAGAGTATCAAGTTTCATAA  
GAGGAAAGAAAGTGATTCCAAGAGGAAAGCTTTCCACAAGAGGGGTCCAGATTGCT  
TCAAATGAGAATGTGGAAACCATGGACTCCAATACCCTGGAACCTAAGAAGCAGATA  
CTGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAATACCAATCAACAAAAGGCATCCGCA  
GGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTTGAAAGA  
GCAACCGTTATGGCAGCATTGAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATGCG  
AACAGAAGTTATAAGAATGATGGAAGGTGCAAAGCCAGAAGATTTGTCTTCCAGG  
GGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCTTCC  
TTTGACATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGAC  
AGTTGAGGAAAAATACCCTTGTTTCTACT

Segment 6—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 30)

ATGAATCCAAACCAAAGATAATAACCATTGGTTCCGTCTGTATGACGATTGGAATG  
GCTAACTTAATATTACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATT  
CAACTTGGAATCAAAATCAGATTGAAACATGCAATCAAAGCGTCATTACTTATGA  
AAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTTAACATCAGCAACACCAACTTTGCTGC  
TGGACAGTCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTCTGCCCTGTTAGT  
GGATGGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTATAAGAATCGGTTCCAAGGGGGATGT  
GTTTGTCATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGAATGCAGAACCTTCTTC

TTGACTCAAGGGGCCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAG  
GAGCCCATATCGAACCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAA  
CTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTGTCATGATGGCATCAATTG  
GCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACA  
ACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAA  
GAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCA  
AGTGATGGACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAA  
ATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGA  
TTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTG  
GGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTT  
CGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTA  
ATGGAGCAAATGGAATAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTTTGGATA  
GGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCGAA  
CGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAA  
ATGAGTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTTCAGCATCCAGAACTAACAGGGCTG  
GATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAA  
CACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTAACAGTGACACTGT  
GGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTAA

Segment 7—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 31)

TAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCGAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAG  
GCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGCTTTGCAGGAAAGAAC  
ACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTGTCACCTCTG  
ACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTG  
CAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACAT  
GGATAGAGCAGTTAACTATAACAAGAAGCTCAAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGG  
CCAAGGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCACCTTGCCAGTTGCATGGGCCTCA  
TATAACAACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCA  
CTTGGAACAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCA  
CCAATCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAG  
GCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGC  
TAATCAGACTAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAGCTC  
CAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAAT  
GGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAATATCATTG  
GGATCTTGACCTGATTATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTTCAAATGTATTTATCG  
TCGCTTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCAT  
GAGGGAAGAATATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATT  
TTGTCAACATAGAGCTAGAGTAA

Segment 8—VIRUS 4 (SEQ ID NO: 32)

```

AACATAATGGACTCCAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCAT
ATCCGCAAGCGATTTCAGACAATGGATTGGGTGATGCCCCATTTCCTTGATCGGCTC
CGCCGAGATCAAAAGTCCTTAAAAGGAAGAGGCAACACCCTTGGCCTCGATATCGA
AACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATCGTGGAATGGATCTTGAAAGAGGAATCCA
GCGAGACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGACA
TGACCCTCGAGGAAATGTCACGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAAAAGATA
ATAGGCCCTCTTTGGGTGCGATTGGACCAGGCGATCATGGAAAAGAACATAGTACT
GAAAGCGAAGTTTCACTGTAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGGC
TTTCACTGAGGAGGGAGCAATAGTTGGAGAAATTCACCATTACCTTCTCTTCCAGG
ACATACTTATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCTCATCGGAGGACTTGAATG
GAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTCGCTTGGAGAACT
GTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGA
GCAATTGGGACAGAAATTTGAGGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACA
GATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATAACATTTATGCAAGCCTTACAA
CTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAACTG
ATAA

```

**[0056]** Las secuencias de aminoácidos de los cuatro aislamientos virales se dedujeron de la determinación de la secuencia nucleótida. El Virus 1 portaba mutaciones de interés en proteínas HA, NA y MA. El Virus 2 portaba mutaciones de interés en proteínas NA y MA. El Virus 3 portaba mutaciones de interés en la proteína NA. El Virus 4 portaba mutaciones de interés en la proteína MA.

**[0057]** Las secuencias HA se analizaron en busca de mutaciones de interés relativas al tipo silvestre de la secuencia pandémica de influenza A H1N1. Los cuatro aislamientos portaban mutaciones P83S y I321V que parecen prevalecer en el clado 7 de la cepa pandémica de A/H1N1.

**[0058]** El virus 1 también tiene (i) un clado 7 con mutación característica S203T y (ii) una mutación D222E en la posición 222 de la secuencia HA. En las posiciones 222-223 el virus 1 tiene aminoácidos E-R en lugar del tipo silvestre D-Q. Una concordancia exacta de la secuencia HA del virus 1 se encuentra en la proteína HA del virus de Influenza A (A/Novgorod/01/2009(H1N1)).

**[0059]** Los virus 1, 2 y 4 portan mutaciones en los residuos I106V, D248N, Y275H del segmento NA (6) relativo a la secuencia del tipo silvestre A/California/07/2009. La mutación Y275H se asocia con la resistencia al oseltamivir. Concordancias exactas de la secuencia NA encontradas en estos tres aislamientos se encuentran en otros aislamientos.

**[0060]** La vacuna de tipo silvestre actual es menos efectiva contra el virus 1 que porta ambas mutaciones HA y NA en estos sitios específicos. (Puzelli et al., Transmission of Hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerging Infectious Diseases* 16(5): 863-865 (2010). Una vacuna generada por un virus (como el virus 1) que porta tanto hipervirulencia (D222G/E en la región HA) como resistencia al oseltamivir (Y275H en la región NA) supera la falta de eficiencia de las vacunas pandémicas de tipo silvestre H1N1 y ofrece protección tanto para virus con hipervirulencia como para virus con resistencia al oseltamivir.

**[0061]** Los virus 1, 2 y 3 portan la mutación A198P en la región M1 (segmento 7) relativa a la secuencia del tipo silvestre A/California/07/2009. Además, estos tres aislamientos carecen de residuo correspondiente D34 en la región M2.

**[0062]** Se ha reportado que esta mutación incrementa la inmunidad mediada por células (pero no protege contra la infección). La región mutada tiene un 60% de similitud en la secuencia con el virus de la influenza B en la región MA y las vacunas generadas contra este aislamiento viral que portan esta mutación pueden generar inmunidad contra la influenza B.

**[0063]** También, la mutación M1 puede usarse como blanco de terapia para eliminación viral y recuperación.

**[0064]** Los métodos de la invención usan los antígenos del virus de influenza aquí revelados para dar inmunidad contra la infección del virus de la influenza. El virus específico del cual se derivan los antígenos puede ser igual o distinto del virus específico del que se proporciona la protección, porque se sabe que puede ocurrir una protección cruzada entre diferentes aislamientos de virus de influenza, en particular, dentro de los mismos subtipos virales.

**[0065]** Las actuales vacunas de influenza en uso se designan vacunas de virus completo (WV) o subvirión (SV) (también llamado "dividido" o antígeno superficie purificado"). La vacuna WV contiene virus inactivado, intacto mientras que la vacuna SV contiene un virus purificado desestabilizado con detergentes que solubilizan la envoltura viral que contiene lípidos, seguido por una inactivación química de virus residual. También se están desarrollando vacunas virales atenuadas contra la influenza. Se puede consultar una discusión sobre métodos

de preparación de vacunas convencionales en Wright, P. F. & Webster, R. G., *FIELDS VIROLOGY*, 4d Ed. (Knipe, D. M. et al. Ed.), 1464-65 (2001),

**[0066]** Mientras que una vacuna incluye más de una cepa de influenza, las distintas cepas se cultivan típicamente de manera separada y se mezclan después de que los virus se han cosechado y que los antígenos han sido preparados. Alternativamente, distintos segmentos de distintos aislamientos de virus de influenza pueden combinarse para generar una vacuna multipotente. El (los) virus de influenza usado(s) en los procesos de la invención pueden ser cepas reordenadas y/o pueden haberse obtenido por técnicas de reversión de genética inversa. Los virus pueden estar atenuados, sensibles a la temperatura o adaptados al frío. Se puede utilizar una cepa reordenada que incluya segmentos virales de HA y/o NA a partir de una cepa patógena y los seis o siete segmentos restantes de una cepa no patógena.

**[0067]** El antígeno de virus de influenza usado en la composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede estar en forma de un virus vivo o, preferentemente, de un virus inactivado. La inactivación del virus normalmente involucra tratamiento con un químico, como la formalina o  $\beta$ -propiolactona. Mientras que cuando se usa un virus inactivado, el antígeno puede ser un virus completo, un virus dividido o subunidades virales. Los virus divididos se obtienen tratando viriones con detergentes (e.g. éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, tri-n-butil fosfato, Tritón X-100, Tritón N101, bromuro de cetil-trimetil-amonio, etc.) para producir preparaciones de subviriones. Las vacunas con subunidad comprenden uno o ambos antígenos superficie de influenza, hemaglutinina y neuraminidasa. Los antígenos de la influenza también pueden presentarse en forma de virosomas.

**[0068]** Cuando un antígeno se prepara a partir de un virus de influenza (i.e. en lugar de ser producido en un sistema sintético o recombinante que no involucra cultivo de virus de influenza. El virus puede hacerse desarrollar en huevos o en cultivo celular. El cultivo en huevos embrionados libres de patógenos es la ruta tradicional por la cual los virus de influenza han sido cultivados para la producción de vacunas y el cultivo celular es un desarrollo más reciente. Cuando se usa cultivo de células, entonces la vacuna de virus será normalmente cultivada en células mamíferas, como células MDCK, células Vero o células PER.C6. Estas líneas celulares se encuentran ampliamente disponibles e.g. en la colección de Cultivo de Células de Tipo Americano (ATCC por sus siglas en inglés) o en los

Coriell Cell Repositories. Por ejemplo, la ATCC provee varias células Vero distintas en los catálogos número CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, así como células MDCK en los catálogos número CCL-34. El cultivo en líneas células aviares, incluyendo células derivadas de gallina, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo, también es posible (CEF).

**[0069]** Las composiciones inmunogénicas y de medicamentos de la invención son propicias para su administración al paciente. Esto puede lograrse de varios modos, incluyendo pero sin limitarse a: inyección intradérmica, administración transdérmica y administración tópica. Estas pueden usarse en conjunto con abrasión de piel, e.g. con papel lija o con el uso de microabrasivos.

**[0070]** Las composiciones inmunogénicas y de medicamentos de la invención se presentan preferentemente como vacunas.

**[0071]** Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes que se han usado en vacunas de influenza incluyen sales de aluminio, quitosano, oligodesoxinucleótidos CpG como el CpG 7909, emulsiones de aceite en agua, como la MF59, emulsiones aceite en agua o agua en aceite, toxina lábil al calor de *E. coli* y sus mutantes desintoxicados, monofosforil lípido A y su derivado 3-O-desacilado, mutantes de toxina pertusis, muramil dipéptido, etc.

**[0072]** La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en las vacunas de influenza inactivadas y las dosis de vacunas están estandarizadas con referencia a niveles HA, normalmente como se miden con una prueba de inmunodifusión radial simple (SRID). Las vacunas de inyección intramuscular normalmente contienen cerca de 15 µg de HA por cepa, aunque también se usan dosis más bajas (e.g. para niños, o en situaciones pandémicas) y se han usado dosis fraccionadas como 1/2 (i.e. 7.5 µg HA por cepa), 1/4 y 1/8. Las composiciones de la invención normalmente contendrán entre 0.1 y 8 µg de HA por cepa de influenza, preferentemente, e.g. cerca de 7.5, cerca de 5, cerca de 3, cerca de 2.5, cerca de 2, cerca de 1.5, cerca de 1, cerca de 0.75, cerca de 0.5, cerca de 0.4, cerca de 0.2 µg, etc.

**[0073]** Las vacunas de inyección intramuscular normalmente tienen un volumen de 0.5 ml. Las composiciones pueden incluir conservadores como el tiomersal o el 2-Fenoxietanol. No obstante, es preferible que las composiciones estén

sustancialmente libres de material de mercurio (i.e. menos de 1µg/ml), e.g. libres de tiomersal. Se prefieren las vacunas que no contienen mercurio.

**[0074]** Cuando el virus de influenza ha sido desarrollado a través de un cultivo celular, las composiciones de la invención contienen preferentemente menos de 100 pg de ADN celular residual del anfitrión por dosis, aunque puede haber presencia de rastros de ADN celular del anfitrión. El ADN contaminante puede ser eliminado durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación estándar e.g. cromatografía, etc. La eliminación del ADN celular residual del anfitrión puede mejorarse con tratamiento de nucleasa, e.g. usando el Benzonase® DNase. Se prefieren las vacunas que contienen <100 pg de ADN celular del anfitrión por 10 µg de hemaglutinina, así como las vacunas que contienen <100 pg de ADN celular del anfitrión por 0.25 ml. de volumen. Se prefieren las vacunas que contienen <100 pg de ADN celular del anfitrión por 50 µg de hemaglutinina, al igual que las que contienen <100 pg de ADN celular del anfitrión por ml. de volumen.

**[0075]** Las vacunas de la invención pueden lanzarse como un régimen de dosis única de inmunización. Alternativamente, pueden lanzarse como el elemento principal de un régimen de combinación "*prime-boost*" (que significa que la primera inmunización es seguida por una segunda inyección de antigenicidad similar después de algunas semanas o meses).

**[0076]** Los métodos para poner a prueba la inmunogenicidad de las vacunas de influenza son bien conocidos en el arte de la técnica. Uno de los métodos involucra el siguiente procedimiento: a) justo antes de la vacunación, se toma del paciente una muestra de sangre de la vena de 10 ml., normalmente del brazo, para titulación con línea de base de anticuerpos anti-HA circulantes; b) inmediatamente después, el paciente recibe una dosis de vacuna que, si se administra en el brazo, será en el brazo opuesto de donde se retiró la sangre; c) Aproximadamente 3 semanas después de la vacunación, se tomará una muestra de sangre de 10 ml. del paciente. Los sueros se separan de las muestras de sangre y se almacenan (si es necesario) a -20°C. Los sueros se someten a pruebas de anticuerpos anti hemaglutinina contra las cepas relevantes por inhibición de hemaglutinina (HI) o hemólisis radial sencilla (SRH). Los sueros positivos y negativos así como las preparaciones de referencia pueden obtenerse de laboratorios de referencia públicos. Las titulaciones de anticuerpos se realizan por duplicado y los sueros antes y después de la vacunación se titulan

simultáneamente. El título asignado a cada muestra es la media geométrica de dos determinaciones independientes (pero, para efectos de cálculo, cualquier resultado HI <10 (=no detectable) se expresa como 5 y cualquier resultado negativo SRH se expresa como 4 mm<sup>2</sup> bajo condiciones estándar).

[0077] En pruebas HI, la seroconversión corresponde a una proporción de títulos pre y post inmunización de  $\geq 40$  y un aumento significativo (e.g. al menos 4 veces) en títulos de anticuerpos. En pruebas SRH la seroconversión corresponde a un área de posvacunación de  $\geq 25$  mm<sup>2</sup> con al menos 50% en el área relativa al área de pre-vacunación.

## EJEMPLOS

[0078] Sin intentar limitar el enfoque de esta invención, a continuación se proporcionan los instrumentos ejemplares, aparatos, métodos y sus correspondientes resultados de acuerdo con las declaraciones de la presente invención. Tenga en cuenta que los títulos o subtítulos pueden usarse en ejemplos a conveniencia del lector, lo que de ninguna manera limita el enfoque de la presente invención. Además, se proponen y revelan ciertas teorías en la presente, pero de ninguna manera, si son o no correctas, se limita el enfoque de la invención en tanto que ésta se lleve a la práctica de acuerdo con la invención sin importar ninguna de las teorías específicas o esquemas de acción.

### EJEMPLO 1: línea celular

[0079] Las células VERO son una línea celular muy bien estudiada, aislada primero del riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) y ampliamente usada en la Microbiología, en la biología celular y en los estudios de virología. Ha sido autorizada en EE.UU. para la producción de vacunas virales (rotavirus y polivirus), también ha sido probada y en algunos casos aprobada para la producción de vacunas contra la rabia, reovirus y encefalitis japonesa. Hemos elegido esta línea celular por su susceptibilidad a la coinfección, así como por su capacidad de desarrollo a escala industrial en fermentadores y bioreactores, características deseables para la producción de vacunas.

[0080] La línea celular VERO usada fue comprada en ATCC y mantenida a -70°C con dimetilsulfóxido (DMSO). Las células se descongelaron de acuerdo con las instrucciones de CORNING.

## **EJEMPLO 2: Condiciones estériles**

**[0081]** Todas nuestras instalaciones en nivel de bioseguridad III III están cuidadosamente tratadas y monitoreadas para evitar contaminación. Regularmente se llevan a cabo pruebas de esterilidad en cuartos, material, reactivos y equipos. El área de cultivo celular se limpia constantemente y se desinfecta cada mes, y se realizan varias rondas de desinfección cada 24, 48 y 72 horas usando Benzal, 70% etanol y 5% cloro. Se realizan pruebas de al final de estas rondas, también, todos los reactivos son sometidos a pruebas de contaminación cultivando una alícuota en medio líquido de tioglicolato.

## **EJEMPLO 3: Propagación celular**

**[0082]** La propagación de células Vero se llevó a cabo de conformidad con condiciones físicas y químicas tales como almacenamiento en matraces de cultivo de células de poliestireno (25 cm<sup>2</sup>, 50 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>). Estos matraces también pasan por rayos Gamma para reducir la hidrofobicidad. Estos contenedores permiten una adhesión celular eficiente y por lo mismo una formación de monocapas. Para incrementar la proliferación celular, se uso medio de crecimiento M199 de DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco) y con suplemento de 10% de suero de feto bovino (BFS) (SIGMA-Aldrich); el mantenimiento de pH fisiológico fue monitoreado usando Rojo de Fenol. Se agregó una mezcla antimicrobiótica (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) y también para inhibir la contaminación micótica se agregó anti-PPLO.

**[0083]** Los cultivos celulares se incubaron a 35°C / 5% CO<sub>2</sub> / 5% de humedad. El crecimiento y calidad de las células se monitoreó con microscopio de contraste de fases, esto nos permite descartar aquéllos cultivos que presentan contaminación bacterial o micótica.

**[0084]** El subcultivo celular de matraces que presentan completa confluencia se lleva a cabo de la siguiente manera:

**[0085]** 1. Remueva y deseche el medio de cultivo.

**[0086]** 2. Brevemente, enjuague la capa celular con solución de tripsina al 0.25% (w/v) - 0.53 mM de EDTA para remover todos los rastros de suero que contienen inhibidor tripsina.

**[0087]** 3. Agregue de 2.0 a 3.0 ml de solución de tripsina EDTA al matraz y observe las células bajo un microscopio invertido hasta que la capa celular se disperse (generalmente de 5 a 15 minutos).

**[0088]** 4. Agregue de 6.0 a 8.0 ml de medio de cultivo completo y aspire las células pipeteando cuidadosamente.

**[0089]** 5. Agregue las alícuotas adecuadas de la suspensión celular a los nuevos recipientes de cultivo.

**[0090]** 6. Incube los cultivos a 37°C.

**[0091]** Cuando se obtuvo el 80% de confluencia, las células fueron inoculadas con el virus p AHN1 a  $1 \times 10^6$ . Este nivel de confluencia fue óptimo para la observación del efecto citopatógeno causado por el virus de influenza A/H1N1.

#### **EJEMPLO 4: Aislamiento viral**

**[0092]** Se realizó el aislamiento viral en matraces de 25cm<sup>2</sup> inoculados con células VERO (80% de confluencia); para el aislamiento viral, se retiró el medio de cultivo, las células fueron centrifugadas y resuspendidas tres veces para descartar los restos celulares. A partir de una muestra en hisopo obtenida de un paciente diagnosticado clínicamente con influenza AH1N1 y confirmado por PCR en tiempo real, se inocularon 50 µl en el cultivo celular y se incubaron durante 30 minutos para permitir la fijación viral a la superficie celular. Subsecuentemente, el M199 fue adicionado con BFS al 1% e incubado a 40°C/40 min.

**[0093]** Los cultivos inoculados fueron monitoreados para detectar la presencia de efecto citopático celular mediante el microscopio de contraste de fases. Simultáneamente, se determinó la carga viral por PCR en tiempo real. Al alcanzar el  $1 \times 10^6$ , los cultivos fueron congelados a -80°C (DMSO 10%) y almacenados para estudios posteriores.

### **EJEMPLO 5: Confirmación de infección viral y cuantificación por RT-PCR en tiempo real.**

[0094] El ARN viral fue extraído de los cultivos celulares VERO utilizando equipo comercial (ROCHE) como se describió anteriormente, después, se cuantificó el ARN por espectrofotometría utilizando equipo NanoDrop. Se realizó el protocolo CDC para la detección de AH1N1 por PCR en tiempo real en un termociclador Light Cycler 480 (ROCHE), incluyendo un estándar para Influenza con el objeto de cuantificar (10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> copias del gen H1 clonado en un plásmido). La determinación de carga viral se realizó calculando el formato de puntos de intersección para cada muestra. La Figura 1 muestra ejemplos de la cuantificación de carga viral.

### **EJEMPLO 6: Selección de muestras**

[0095] Un total de 193 de 3760 muestras positivas de pAH1N1 para secuenciación con base en datos clínicos y epidemiológicos. Los criterios clínicos para la selección fueron: severidad de la infección, resistencia del medicamento y escenario clínico atípico. Los criterios epidemiológicos se basaron en lugar, género y edad. Las muestras seleccionadas fueron recolectadas durante los 4 puntos más álgidos del brote reportados de Marzo a Noviembre de 2009. Las muestras fueron resuspendidas en 2.5 ml de medio de transporte viral y se prepararon y almacenaron alícuotas de 500 µl a -70 °C.

### **EJEMPLO 7: Extracción de ácido nucleico**

[0096] Los ácidos nucleicos totales de las muestras clínicas fueron aislados y resuspendidos en agua desionizada (100µ) utilizando el Kit de MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation (Roche) en el instrumento MagNA Pure LC (Roche) mediante el protocolo de Lisis Externa de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en resumen: 500 µl de la muestra fueron colocados en el cartucho de ácido nucleico MagNA Pure y se agregó un volumen de solución amortiguadora de lisis, posteriormente, se establecen y se inician todos los parámetros. El ARN extraído fue colocado a -70°C para análisis posteriores.

### **EJEMPLO 8: Detección de Influenza p/AH1N1 por PCR en tiempo real**

[0097] La detección de Influenza pandémica AH1N1/09 fue realizada por medio de dos métodos: Set de detección Real-time ready Influenza A/H1N1 (Roche),

utilizando el kit Real-time ready RNA Virus Master 53 (Roche). El proceso de ciclos térmicos fue realizado con instrumentos Light Cycler (Roche) bajo las siguientes condiciones: 30 min a 50 °C; 15 min a 95 °C; 45 ciclos de 15 s a 94 °C; y 30 s a 60°C.

**[0098]** El segundo método fue el protocolo de RT-PCR en tiempo real para influenza A (H1N1), utilizando los partidores y sondas descritos en el protocolo anterior y el kit one step RT-PCR Invitrogen SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative. El proceso de ciclos térmicos fue realizado con instrumentos Light Cycler 2.0 (Roche) bajo las siguientes condiciones: 50 min a 50 °C; 2 min a 95 °C; 45 ciclos de 15 s a 95°C; y 30 s a 55 °C.

**[0099]** Todas las reacciones en ambos métodos fueron realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando 5 µl del ARN total en un volumen de reacción total de 20 µl. En ambos métodos de detección se incluyó un control interno (gen humano de miostatina para el método Roche y RnaseP para el protocolo CDC).

**[0100]** Cada muestra fue probada y el PCR en tiempo real por separado utilizando las siguientes sondas: Influenza A (InfA), porcina universal (SwFlu A), Hemagglutina porcina (SwH1) y un control interno para el ácido nucleico humano RNaseP (RP). Se introdujeron controles positivos y negativos.

**[0101]** La mezcla de reacción contenía 0.8 µM de cada partidor, 0.2 µM de cada sonda, solución amortiguadora PCR 1X y 0.5 U de SuperScript III/Platinum Taq Mix (Invitrogen).

**[0102]** La Figura 2 muestra un ejemplo de ordenación de muestra.

**[0103]** Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

**[0104]** Transcripción inversa — 50°C / 30 min

**[0105]** Inactivación — 15°C / 2 min

**[0106]** Extensión — 95°C / 15 ciclos y 55°C / 30 ciclos.

### **EJEMPLO 9: Análisis de datos**

**[0107]** Los resultados fueron analizados de acuerdo con los criterios de la OMS de la siguiente manera:

**[0108]** 1.- No debe haber fluorescencia en el control negativo.

**[0109]** 2.- Las muestras experimentales deben presentar fluorescencia para la sonda RP.

**[0110]** 3.- El control de ácido nucleico humano no debe emitir fluorescencia para las sondas InfA, SwFluA y SwH1.

**[0111]** 4.- El control positivo (A/H1N1 ácido nucleico) debe emitir fluorescencia para todos los partidores y sondas.

**[0112]** 5.- Si se satisfacen todos los criterios, la muestra se considera positiva.

**[0113]** Las Figuras 3A y 3B muestran vistas gráficas de la interfaz del termociclador en tiempo real Light Cycler 2.0 mostrando curvas de fluorescencia. Fig. 3A) Muestra clínica. Fig. 3B) detección RNaseP (RP).

### **EXAMPLE 10: Secuenciación**

**[0114]** Se aisló un total de 950 virus por cultivo celular, de los cuales se obtuvieron 193 secuencias genéticas parciales de Neuraminidasa (NA) y 197 de Hemaglutinina (HA) mediante secuenciación de capilaridad en una máquina de secuenciación ABI 3100 (Applied Biosystems). Dado que la HA y la NA son las secuencias más variables en el AH1N1, un análisis in silico (análisis filogenético y BLAST) demostró que las 386 (secuencias HA y NA) podían ser agrupadas en 20 grupos, por lo tanto, el genoma completo de un miembro representativo de cada grupo fue pirosecuenciado en un equipo de Pirosecuenciación 454 Titanium Roche Pyrosequencing (ROCHE).

### **EJEMPLO 11: Propagación del virus de influenza en un embrión de pollo**

**[0115]** Se realizaron varios intentos para propagar los candidatos propuestos para la vacuna de la influenza en células VERO. Sin embargo, estos intentos fallaron

inicialmente porque la cantidad de virus recuperado fue muy baja incluso después de 3 pasajes. Considerando esto, se realizaron uno o dos pasajes en pollos embriones SPF (exentos de patógenos específicos). Estos fueron inoculados en el fluido amniótico con 0.1 ml de cada candidato. Otros 40 virus previamente aislados durante el periodo de gripe pandémica también fueron incluidos y la inoculación se realizó utilizando dos huevos para cada virus.

**[0116]** Después de tres días a 35°C el fluido amniótico fue extraído de cada embrión infectado y el líquido recolectado fue centrifugado a 3000xg para eliminar restos celulares y el sobrenadante fue analizado mediante qRT-PCR y almacenado a -80°C. Todos los procedimientos fueron realizados de conformidad con el nivel de bioseguridad III siguiendo los estándares requeridos para evitar riesgos de bioseguridad.

**[0117]** Después del pasaje dentro del embrión la carga viral fue muy alta para tres cepas, una de ellas era el virus candidato. Se detectaron diez cepas aisladas más mediante la prueba RT-PCR pero mostraron cargas virales bajas. Por lo tanto, fueron inoculadas nuevamente en otro embrión de pollo SPF pero, este caso, la inoculación fue realizada en el fluido alantoideo. Después de 72 hrs de incubación siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente, el virus fue extraído recolectando solamente el fluido alantoideo. Se analizó un volumen más bajo utilizando la técnica RT-PCR y el resto fue almacenado a -80°C. Los resultados mostraron que seis de las diez cepas aisladas fueron capaces de reproducirse con alta eficacia mostrando alta carga viral.

#### *Certificado de secuencia del Karolinska Institute*

**[0118]** Anterior a la propagación del embrión de pollo, la cepa viral cDNA fue enviada al instituto Karolinska para verificar la secuencia mediante un sistema pirosecuenciador 454 ROCHE. El análisis bioinformático confirma la secuencia determinada previamente en nuestro laboratorio.

#### *Identificación de la semilla primaria*

**[0119]** El nombre del virus candidato para la vacuna contra la influenza fue HZFLUJAL.

#### *Adaptación del virus de influenza para su crecimiento en la línea de células VERO*

**[0120]** El virus candidato (HZFLUJAL) y otros dos virus extraídos del embrión fueron inoculados en la línea de células VERO. Con el objeto de lograr la adaptación, se realizaron varios pasajes, recolectando el sobrenadante del cultivo después de 7 a 10 días de infección. Cada sobrenadante fue utilizado para infectar un nuevo pasaje de células VERO. Se cuantificó la carga viral de cada pasaje. La Figura 4A muestra las diferencias entre la carga viral en el embrión y los respectivos subcultivos del mismo virus. En dicha figura se muestra claramente que la adaptación viral a esta línea de células de tejido podía ser obtenida hasta los cuatro pasajes.

#### *Adaptación del virus de influenza para su crecimiento en la línea de células MDCK*

**[0121]** No solamente la línea de células VERO fue evaluada como sustrato del virus de influenza, sino también la línea de células MDCK fue utilizada para propagar el virus. Los mismos procedimientos aplicados para la adaptación de las células VERO fueron realizados para las células MDCK. Los resultados preliminares muestran una mejor adaptación a esta línea celular porque aparentemente solamente se necesitaron tres pasajes para obtener una carga viral más alta que la del embrión de pollo (Figura 4B).

#### *Propagación del virus para obtener la semilla primaria HZFLUJAL*

**[0122]** Para la propagación del virus previamente adaptado para su crecimiento en la línea de células VERO, se descongeló un criovial del cuarto pasaje en las células VERO y se utilizó para infectar las células VERO en matraces de 175 cm<sup>2</sup>. Después de 10 días a 33°C en un incubador CO<sub>2</sub>, se obtuvieron 120 ml de semilla primaria, la cual mostró una carga viral mayor a 10<sup>7</sup> partículas virales/ml (aproximadamente 10<sup>7.7</sup>). Se obtuvieron 120 crioviales con 1 ml de semilla primaria.

#### *Control de calidad de la semilla primaria*

**[0123]** Se realizaron las pruebas de esterilidad y de hemaglutinación en la semilla primaria. Para la primera, fueron descongelados 4 crioviales de semilla primaria, dos fueron utilizados para inocular dos matraces con 100 ml de Medio Líquido de Tioglicolato NH, y los otros dos crioviales fueron destinados a la inoculación del medio DMEM sin antibióticos. Ambos medios fueron incubados a 35 °C de 8 a 15

días. No se observó crecimiento ni cambio en los medios después del periodo de incubación, por lo tanto se consideró estéril (libre de bacterias, hongos y protozoos).

**[0124]** La prueba de hemaglutinación fue realizada para determinar el título de hemaglutinina en la semilla primaria. Para este ensayo, se realizaron diluciones seriales de

1:2 a 1:1024 de semilla primaria en PBS, pH=7.4, en una microplaca en forma de U de 96 pozos. Se agregó el mismo volumen de suspensión de eritrocito humano del grupo O 0.5% (v/v) en PBS a cada dilución. La microplaca fue incubada 2 horas a 4°C, los resultados mostraron un título de hemaglutinación de 1:8.

## **EJEMPLO 12: Ensayos previos preclínicos utilizando la vacuna HZFLUJAL**

### *Inactivación de virus para los ensayos previos preclínicos*

**[0125]** Para realizar el ensayo previo preclínico, se descongeló un criovial de semilla primaria y se utilizó para infectar un cultivo VERO en un matraz de 80cm<sup>2</sup> después de 7 días a 33°C en un incubador CO<sub>2</sub>. El cultivo fue inactivado mediante formalina a una concentración final de 0.02% (v/v) para 18h a 35 °C. La formalina fue eliminada dializando contra DMEM cuatro veces en 48h. Posteriormente, el título de hemaglutinina fue cuantificado, siendo nuevamente de 1:8. La suspensión viral inactivada fue ajustada a 10<sup>6</sup> partículas virales por 25µl y utilizadas como vacuna en los grupos mencionados más adelante.

### *Modelo animal para ensayos previos preclínicos*

**[0126]** Se emplearon ratones hembras BALB/c de 7 a 8 semanas para los ensayos previos preclínicos. Cada grupo fue colocado en un estante cubierto con filtros Hepa. Todos los animales fueron manipulados evitando sufrimiento innecesario. Cuando el protocolo fue finalizado a todos los ratones se les practicó la eutanasia.

### *Ensayos de seroconversión en pruebas previas preclínicas*

**[0127]** Se realizaron ensayos de seroconversión en nueve grupos de 5 ratones cada uno.

[0128] Grupo 1 vacuna con  $10^6$  partículas virales + factor de transferencia + administración sublingual

[0129] Grupo 2 vacuna con partículas virales  $10^6$  + factor de transferencia + administración intramuscular

[0130] Grupo 3 vacuna con partículas virales  $10^6$  + administración sublingual

[0131] Grupo 4 vacuna con partículas virales  $10^6$  + administración intramuscular

[0132] Grupo 5 vacuna comercial + administración sublingual

[0133] Grupo 6 vacuna comercial + administración intramuscular

[0134] Grupo 7 DMEM sin suero fetal Bovino + administración sublingual

[0135] Grupo 8 DMEM sin suero fetal Bovino + administración intramuscular

[0136] Grupo 9 sin tratamiento

*Ensayos dosis-respuesta en pruebas previas preclínicas*

[0137] Se realizaron ensayos dosis-respuesta en cinco grupos de 3 ratones cada uno.

[0138] Grupo A Vacuna con partículas virales  $10^7$  + factor de transferencia + administración sublingual

[0139] Grupo B Vacuna con partículas virales  $10^5$  + factor de transferencia + administración sublingual

[0140] Grupo C Vacuna con partículas virales  $10^4$  + factor de transferencia + administración sublingual

[0141] Grupo D Vacuna con partículas virales  $10^3$  + factor de transferencia + administración sublingual

**[0142]** Grupo E Vacuna con partículas virales  $10^2$  + factor de transferencia + administración sublingual

**[0143]** Desde el comienzo del protocolo de inmunización todos los ratones fueron mantenidos durante 4 días en un cuarto de experimentación animal el cual cuenta con los requerimientos de bioseguridad para la realización de ensayos inmunológicos. Después del tiempo de adaptación se registraron datos clínicos como el peso y apariencia, y se extrajo una muestra de sangre sin anticoagulante de cada ratón antes de la inmunización. Subsecuentemente, cada grupo fue inoculado mediante la respectiva ruta de administración. Se obtuvieron cuatro muestras de sangre de cada ratón a 7, 14, 21 and 28 días posteriores a la inmunización.

**[0144]** Se obtuvo suero mediante la centrifugación de las muestras de sangre y fue utilizado para la detección de anticuerpos IgG2 contra el virus de Influenza A H1N1. Además se recolectaron muestras de secreciones de los ratones para detectar la presencia de secreción de inmoglobulina A (IgA).

### **EJEMPLO 13: Detección de anticuerpos contra la influenza p/AH1N1 generados por la vacuna CIATEJ/OPKO**

**[0145]** Se desarrolló una vacuna ejemplar, descrita aquí como vacuna CIATEJ/OPKO en células Vero, y fue probada para conocer su capacidad de generación de anticuerpos contra la influenza pandémica AH1N1. El antígeno desarrollado por la CIATEJ/OPKO en células Vero fue capaz de inducir la producción de anticuerpos al ser empelada como vacuna en ratones.

**[0146]** El título de anticuerpos inducido por el antígeno CIATEJ/OPKO fue mayor que el de la vacuna comercial. La FIGURA 5 muestra los anticuerpos totales contra la influenza p/AH1N1 detectados por ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF= Factor de Transferencia. La inmunización fue realizada en ratones hembras BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue sublingual o intramuscular.

**[0147]** La FIGURA 6A muestra anticuerpos IgM contra influenza p/AH1N1 detectada en suero por ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF = Factor de Transferencia. La inmunización fue realizada en

ratones hembra BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue intramuscular.

**[0148]** Cuando el factor de transferencia fue agregado a la vacuna CIATEJ/OPKO, se quintuplicaron los niveles de anticuerpos IgG, de la misma manera que el factor de transferencia triplicó los títulos del anticuerpo IgM durante la primera semana de inmunización. La FIGURA 6B muestra los anticuerpos IgG contra la influenza p/AH1N1 detectados en suero por ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF = Factor de Transferencia. La inmunización fue realizada en ratones hembra BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue intramuscular.

**[0149]** La administración intramuscular de la vacuna CIATEJ/OPKO mostró una inducción mayor de anticuerpos IgG<sub>2A</sub> que la de administración sublingual. La FIGURA 7A muestra anticuerpos IgG<sub>2A</sub> contra la influenza p/AH1N1 detectados en suero mediante ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF = Factor de Transferencia. La inmunización fue realizada en ratones hembra BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue sublingual o intramuscular.

**[0150]** La FIGURA 7B muestra la dosis-respuesta de IgG<sub>2A</sub> contra la influenza p/AH1N1 detectada en suero mediante ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF = Factor de Transferencia. La inmunización fue realizada en ratones hembra BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue sublingual.

**[0151]** La administración intramuscular de la vacuna CIATEJ/OPKO mostró inducción de anticuerpos IgA a niveles comparables a los de la administración sublingual. La FIGURA 8A muestra los anticuerpos IgA contra la influenza p/AH1N1 detectados en mucosa respiratoria mediante ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF = Factor de Transferencia. La inmunización fue realizada en ratones hembra BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue sublingual o intramuscular (día 21 después de la inmunización).

**[0152]** La FIGURA 8B muestra la relación dosis-respuesta IgA contra la influenza p/AH1N1 detectada en mucosa respiratoria mediante ELISA. La vacuna CIATEJ/OPKO fue desarrollada en células Vero, TF = Factor de Transferencia. La

inmunización fue realizada en ratones hembra BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. La inmunización fue sublingual o intramuscular (día 21 después de la inmunización).

## REFERENCIAS

- [0153] Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit. Version December 2008. Kit for isolation of total viral nucleic acids from mammalian serum, plasma and whole blood. Cat. No.03 038 505 001.
- [0154] SuperScript III Platinum One Step Quantitative RT-PCR System. Cat. No. 11738-088.
- [0155] World Health Organization. CDC protocol of Real time for Influenza A (H1N1). April 29 2009.
- [0156] CENAVECE-INDRE. Lineamientos para la red Nacional de laboratorios de salud pública e institutos nacionales de salud para vigilancia de influenza en Mexico 2009.
- [0157] Ammerman N, Beier M., and Azad F. 2008 Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. Curr Protoc Microbiol. Pp. 1-10.
- [0158] Erlich H., Müller M., Helen M., Tambyah P., Joukhadar M., Montomoli M., Fisher D., Berezuk D., Fritsch M., Löw-Baselli A., Vartian N., Bobrovsky R., Borislava G., Pavlova, Pöllabauer E., Kistner O., and Barrett N. 2008 A Clinical Trial of a Whole-Virus H5N1 Vaccine Derived from Cell Culture for the Baxter H5N1 Pandemic Influenza Vaccine Clinical Study Team. N. Engl. J. Med. 358;24. Pp. 2573-2584.
- [0159] Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". 2003. Manual de procedimientos para el diagnostico de laboratorio de la infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Organización panamericana de la salud. Organización mundial de la salud.
- [0160] Kistner O., Howard K., Spruth M., Wodal W., Brühl P., Gerencer M., Crowe B., Savidis H., Livey I., Reiter M., Mayerhofer I., Tauer C., Grillberger L., Mundt G., Falkner F., and P. Noel. 2007 Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. Baxter AG, Biomedical Research Center, Uferstrasse, Austria. Vaccine. 2007 10; 25(32). P. 6028-6036.

**[0161]** Reina J., Fernández V., Blanco I. y Munar M. 1997. Comparison of Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK) with a Green Monkey Continuous Cell Line (Vero) and Human Lung Embryonated Cells (MRC-5) in the Isolation of Influenza A Virus from Nasopharyngeal Aspirates by Shell Vial Culture. American Society for Microbiology Vol. 35, No. 7. P. 1900-1901.

**[0162]** Ryan John. Ph.D. Introduction to animal cell culture. Corning Incorporated Life Sciences 900 Chelmsford St. Lowell, Bulletin Technical. MA 01851. P. 1-24.

**[0163]** Ryan John. Ph.D. Subculturing Monolayer cell cultures Protocol Corning Incorporated Life Sciences 900 Chelmsford St. Lowell, MA 01851. P. 1-5. Sheets R. 2000 History and Characterization of the Vero Cell Line. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting to be held.

**[0164]** Todas las publicaciones y solicitudes de patentes citadas en esta especificación son incorporadas en la presente por referencia, como si cada publicación individual o solicitud de patente fuera específica e individualmente indicada para ser incorporada por referencia.

**[0165]** Aunque la invención mencionada ha sido descrita con cierto detalle por medio de ilustraciones y ejemplos para efectos de una clara comprensión, seguramente les parecerá, a aquellos que son expertos en el ámbito, a la luz de los preceptos de esta invención, que pudieran realizarse ciertos cambios y modificaciones a la misma sin alejarse de la esencia o ámbito de la reivindicación adjunta.

**REIVINDICACIONES**

Lo que se reivindica es:

1. Una vacuna de virus de influenza que contiene un virus de influenza que consta al menos de:

a) Un segmento génico de hemaglutinina (HA) que contiene una secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 34 derivado de la cepa aislada del virus 1 del virus de influenza AH1/N1 de la influenza pandémica, y

b) Un segmento génico de neuraminidasa (NA) que contiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 39 derivado de la cepa aislada del virus 1 del virus de influenza AH1/N1 de la influenza pandémica.

2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el segmento génico HA contiene una secuencia de aminoácido codificada por la secuencia nucleótida del segmento 4 del virus 1 (SEQ ID NO: 4).

3. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el segmento génico HA contiene una secuencia HA específica de clado 7 del virus de influenza AH1/N1 de la influenza pandémica.

4. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el segmento génico HA contiene una mutación en el residuo D222 del tipo silvestre del virus de influenza A H1/N1de la influenza pandémica.

5. La vacuna de la reivindicación 4, en la que el segmento génico HA contiene una mutación D222E.

6. La vacuna de la reivindicación 4, en la que el segmento génico HA contiene una mutación S203T relativa al tipo silvestre del virus de influenza A H1/N1de la influenza pandémica.

7. La vacuna de la reivindicación 4, en la que el segmento génico HA consta además de una o más mutaciones P83S y I321V.

8. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el segmento génico NA contiene una secuencia de aminoácido codificada por la secuencia neucleotídica del segmento 6 del virus 1 (SEQ ID NO: 6).

9. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el segmento génico NA contiene una mutación Y275H relativa al tipo silvestre del virus de influenza A H1/N1 de la influenza pandémica.

10. La vacuna de la reivindicación 9, en la que el segmento génico NA consiste además de uno o más mutaciones I106V, D248N.

11. La vacuna de la reivindicación 1, contiene además:

c) un segmento de gen matriz (MA) codificando un péptido M1 que contiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 50 derivado de la cepa aislada del virus de influenza AH1/N1 de la influenza pandémica.

12. La vacuna de la reivindicación 11, en la que el segmento génico MA contiene una secuencia de aminoácido codificada por la secuencia neucleotídica del segmento 7 del virus 1 (SEQ ID NO: 7).

13. La vacuna de la reivindicación 11, en la que el segmento del gen matriz (MA) que codifica un péptido M2 que contiene una secuencia de aminoácido amino de SEQ ID NO: 51 derivado de la cepa aislada del virus de influenza AH1/N1 de la influenza pandémica.

14. La vacuna de la reivindicación 11, en la que el péptido M1 contiene una mutación A198P.

15. Un método para inmunizar a un paciente contra el virus de la influenza que incluye, como uno de los pasos, la administración al paciente de una vacuna de influenza de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

16. Un método para inmunizar a un paciente contra el virus de influenza hipervirulenta que incluye, como un paso, la administración al paciente de una vacuna de influenza de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

17. Un método para inmunizar a un paciente contra el virus de influenza resistente al oseltamivir, que incluye, como un paso, la administración al paciente de una vacuna de influenza de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

18. Una vacuna, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es una vacuna de reordenamiento.

19. Una vacuna, de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el virus de influenza reordenante se obtiene por reordenamiento clásica.

20. Una vacuna, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es una vacuna viva atenuada o vacuna inactivada.

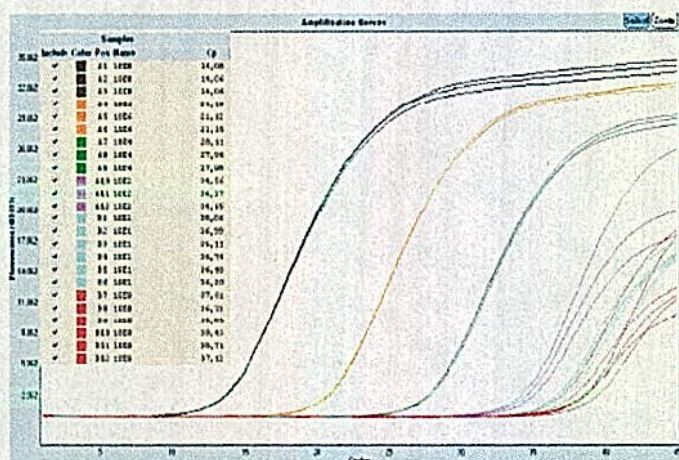
21. Una vacuna, según la reivindicación 20, que es formulada para administración oral o intranasal.

22. Un método de preparación de vacuna para la inmunización del individuo contra una cepa de virus de influenza hipervirulenta que incluye, como un paso, la mezcla del virus de influenza reordenante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 con un portador y de manera opcional, un adyuvante.

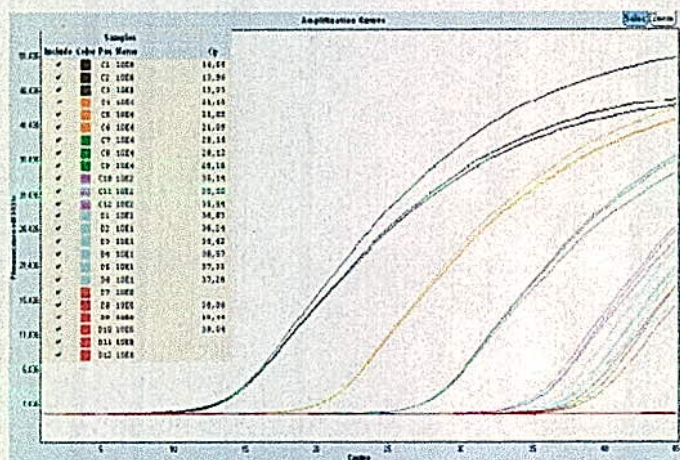
RESUMEN

La invención se refiere a vacunas contra el virus de influenza, en particular a un virus de influenza en la que al menos, el gen de hemaglutinina contiene una mutación D222, y un gen de neruaminidasa resistente al oseltamivir. En algunas de las implementaciones en particular, la vacuna del virus de influenza comprende además una mutación que incrementa la respuesta inmune específica en humanos. El virus es útil para la producción de vacunas contra la influenza resistente al oseltamivir e hipervirulenta.

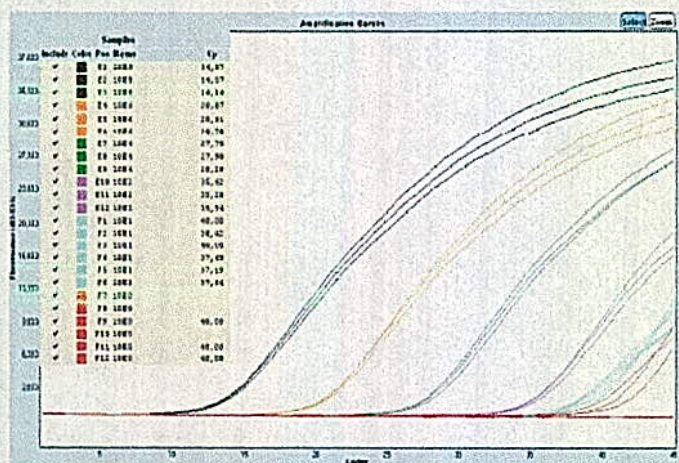
FIGURA 1



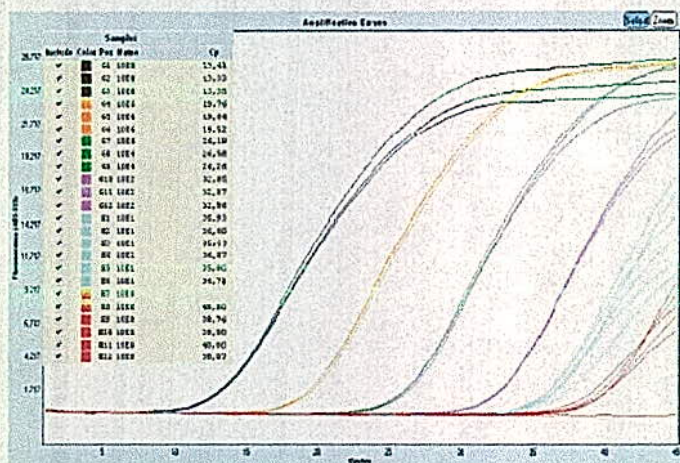
## Ensayo #5



## Ensayo #8



## Ensayo #10



## Ensayo #13

### Datos suplementarios figura 2

FIGURA 2

Ejemplo de configuración de prueba

|   | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    |
| B | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA |
| C | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    |
| D | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      |
| E | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    | InfA    |
| F | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA | sw InfA |
| G | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    | swH1    |
| H | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      | RP      |

Ejemplo de configuración de muestra

|   | 1   | 2  | 3  | 4  | 5  | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | NTC | S1 | S3 | S5 | S7 | S9  | S11 | S13 | S15 | S17 | S19 | PTC |
| B | NTC | S1 | S3 | S5 | S7 | S9  | S11 | S13 | S15 | S17 | S19 | PTC |
| C | NTC | S1 | S3 | S5 | S7 | S9  | S11 | S13 | S15 | S17 | S19 | PTC |
| D | NTC | S1 | S3 | S5 | S7 | S9  | S11 | S13 | S15 | S17 | S19 | PTC |
| E |     | S2 | S4 | S6 | S8 | S10 | S12 | S14 | S16 | S18 | HSC |     |
| F |     | S2 | S4 | S6 | S8 | S10 | S12 | S14 | S16 | S18 | HSC |     |
| G |     | S2 | S4 | S6 | S8 | S10 | S12 | S14 | S16 | S18 | HSC |     |
| H |     | S2 | S4 | S6 | S8 | S10 | S12 | S14 | S16 | S18 | HSC |     |

68

FIGURA 3A

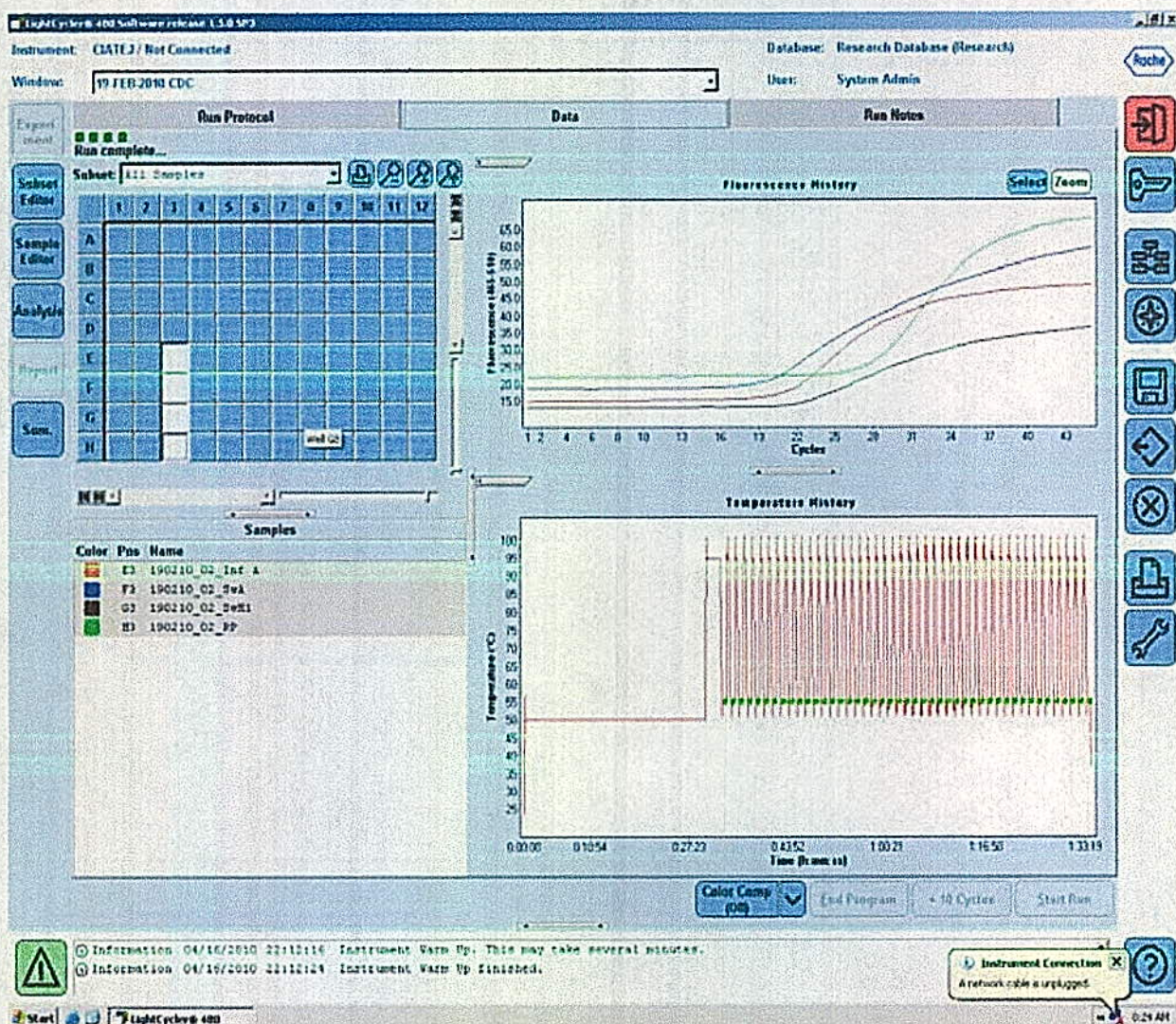
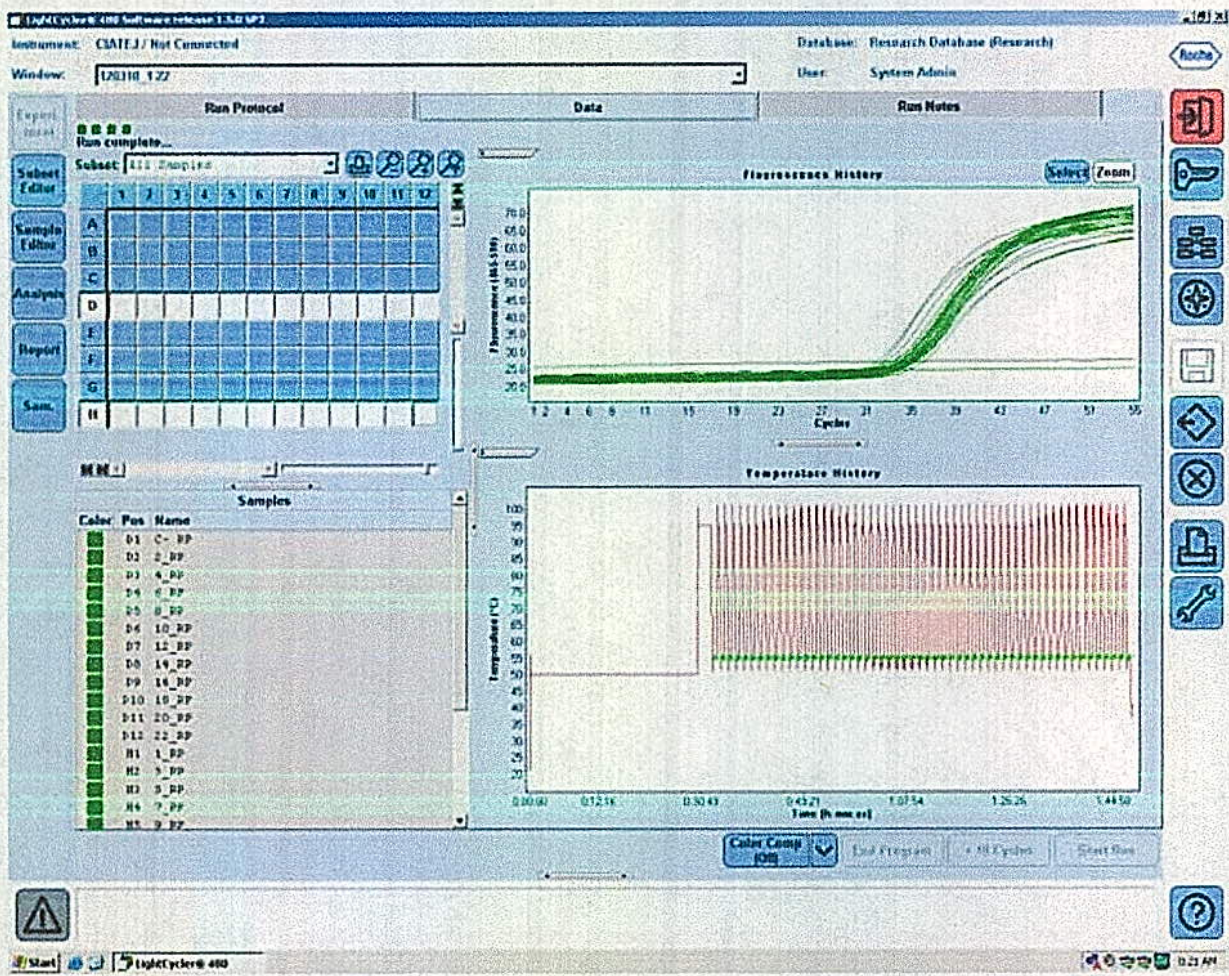
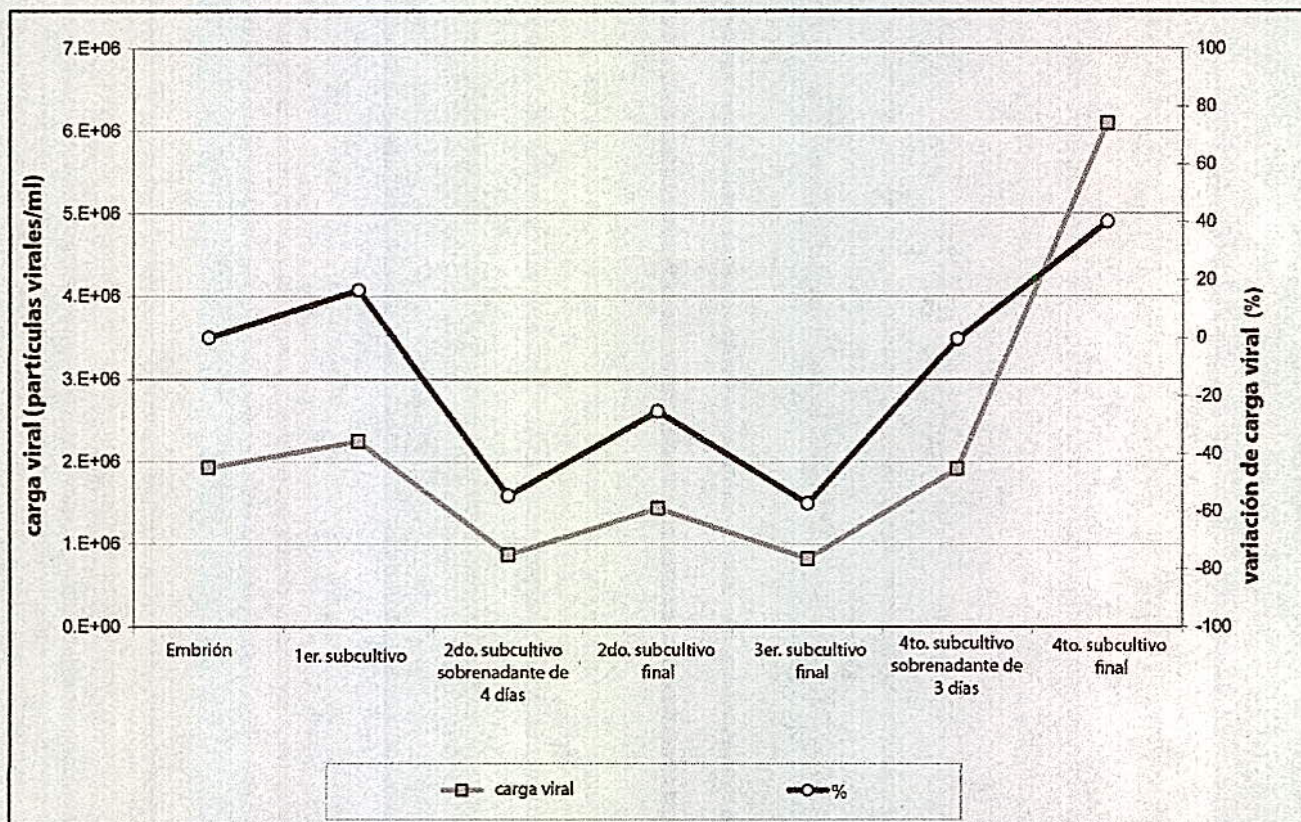


FIGURA 3B



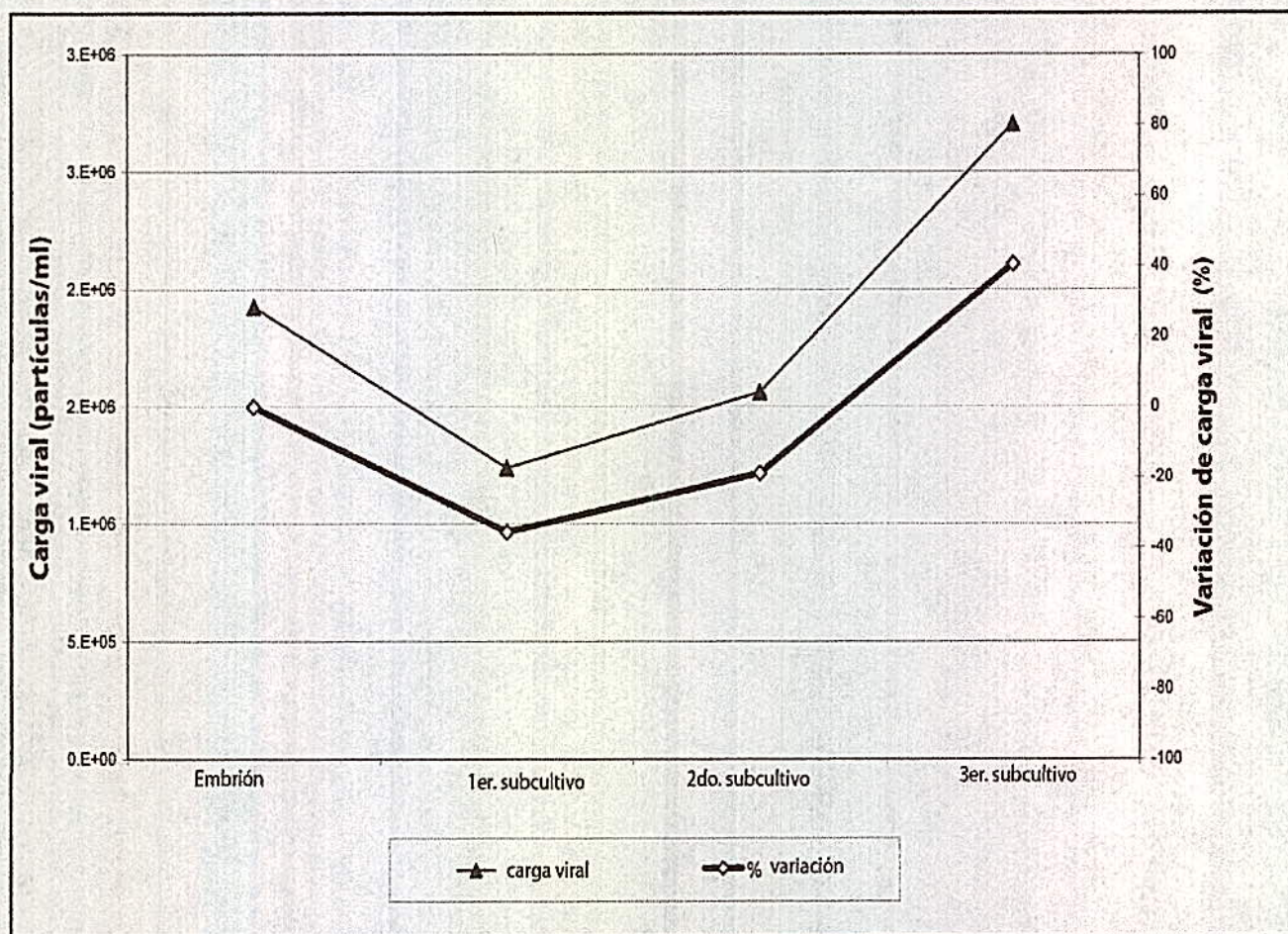
OK

FIGURA 4A



71

FIGURA 4B



79

FIGURA 5

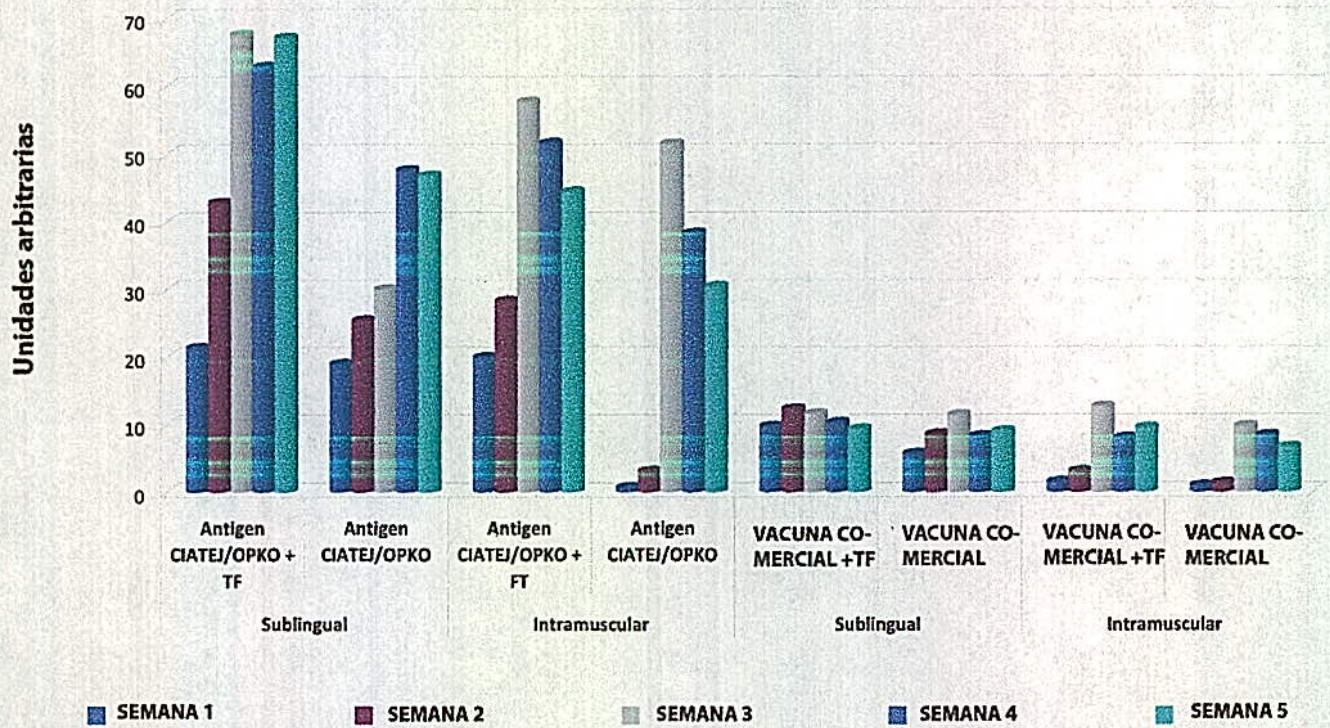


FIGURA 6A

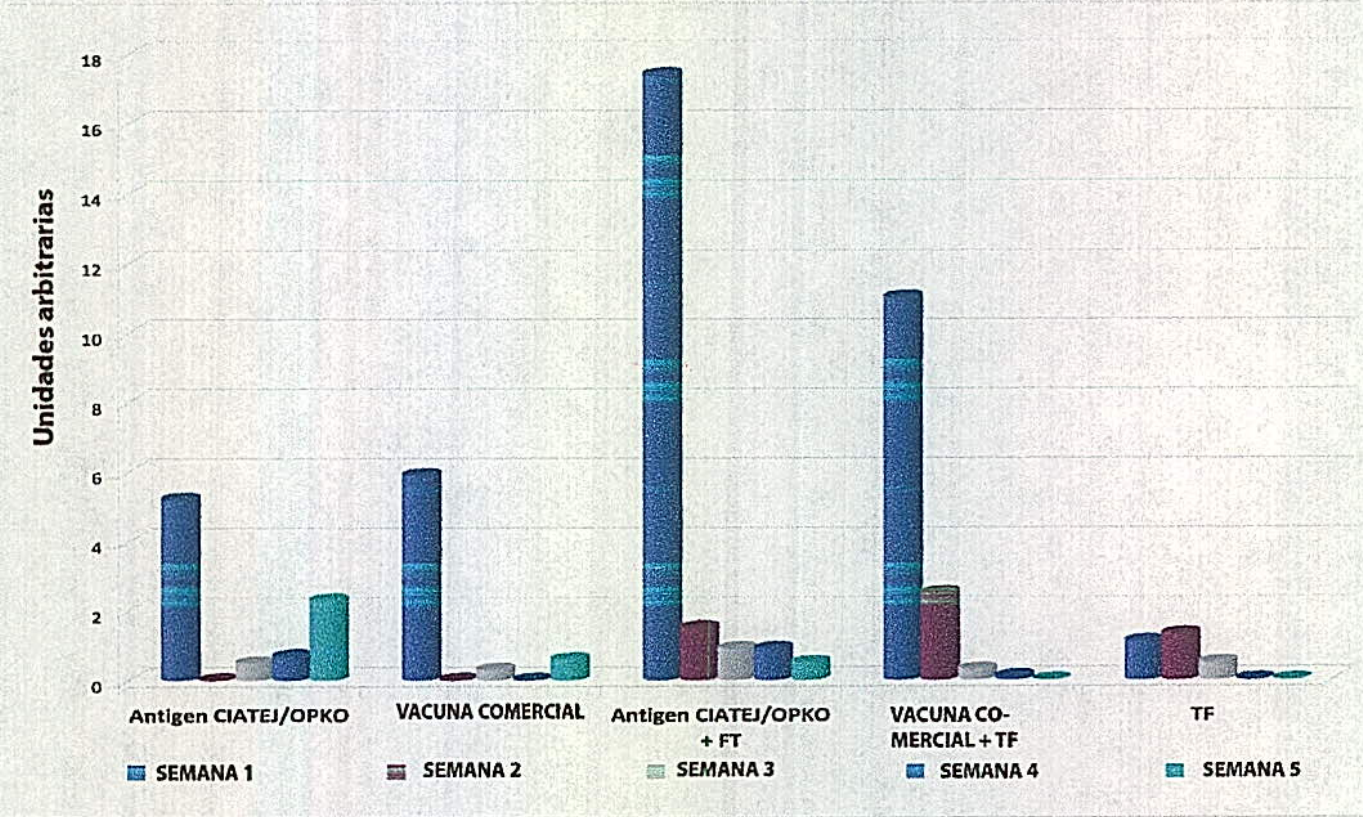
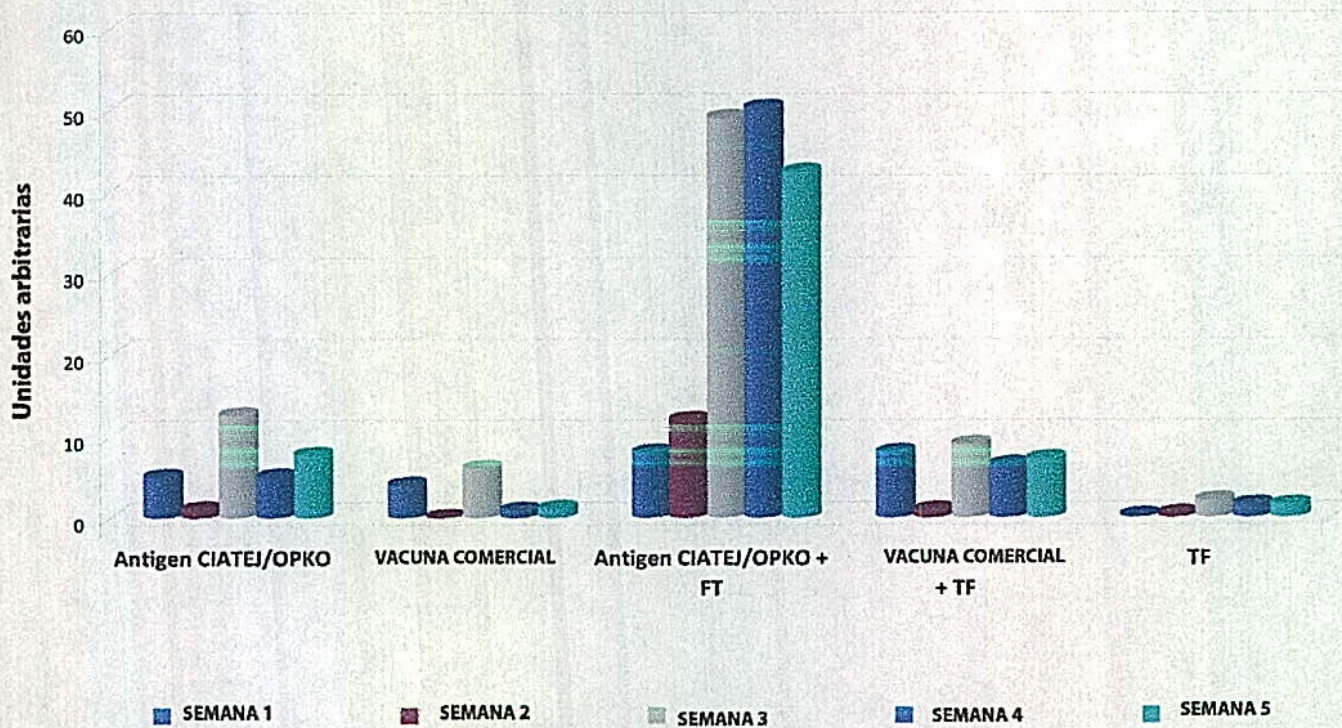


FIGURA 6B



75

FIGURA 7A

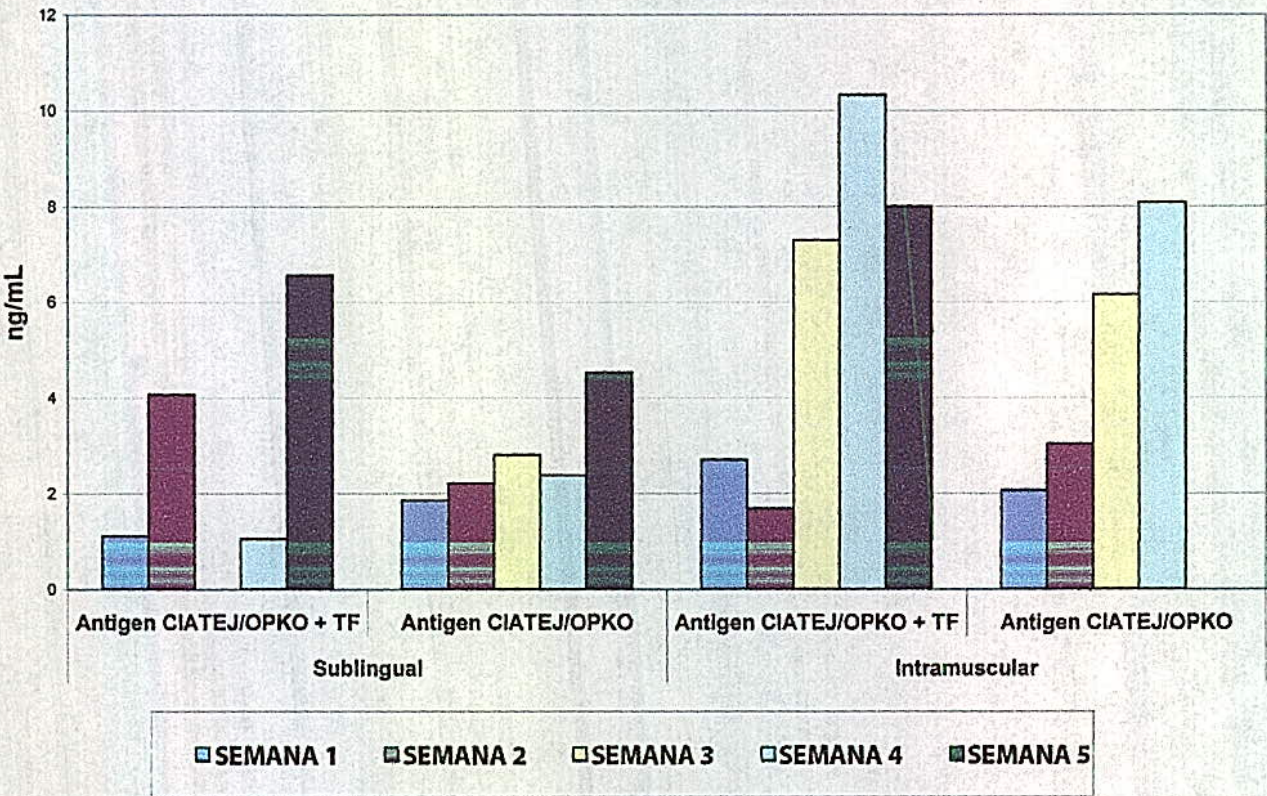
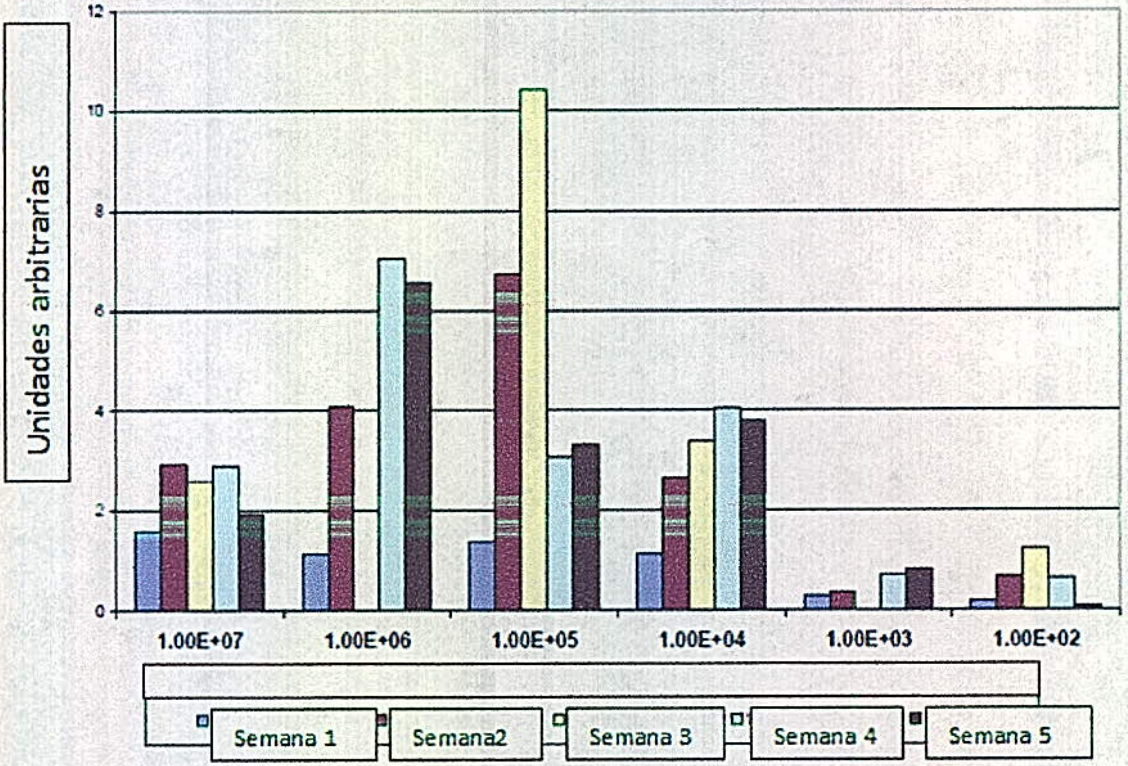


FIGURA 7B



77

FIGURA 8A

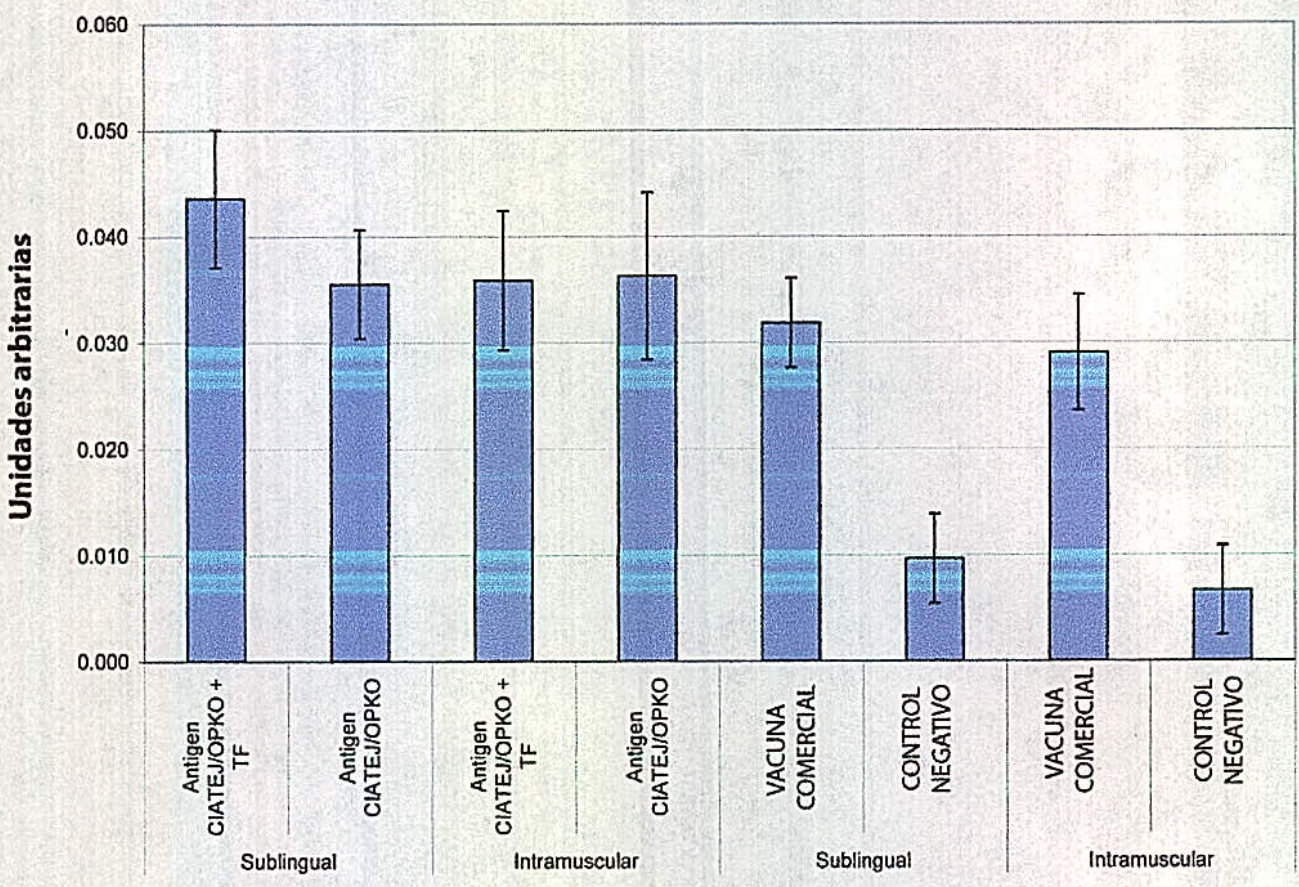
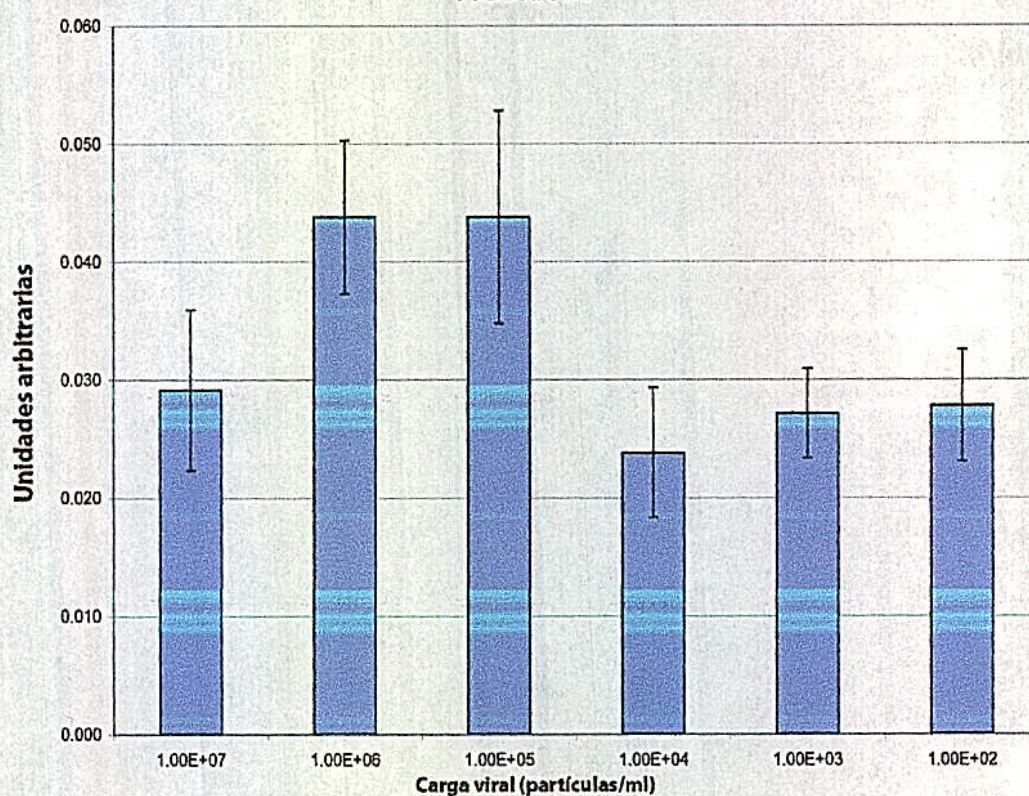


FIGURA 8B



## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0052778

Bogotá D.C., Mayo 30 de 2013 - 16:04:10

RECIBIDO DE : VERA ABOGADOS ASOCIADOS S.A.

NI 830.026.910

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO   |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 577129044 | 30/05/2013 | 309.000.00 |
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 577129066 | 30/05/2013 | 500.000.00 |
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 577129070 | 30/05/2013 | 30.000.00  |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr.UNDITARIO

Vr.CONCEPTO

1 50005-01-01 SOLICITUDES

1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE  
INVENCION

500.000.00

500.000.00

\$500.000.00

SON: \*\*QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-133991- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:06:16

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 80

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Mayo 30 de 2013 - 16:04:11

80

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0052783

Bogotá D.C., Mayo 30 de 2013 - 16:05:53

RECIBIDO DE : VERA ABOGADOS ASOCIADOS S.A. NI 830.026.910

R

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO   |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 528257752 | 30/05/2013 | 103.000.00 |
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 577129055 | 30/05/2013 | 360.000.00 |
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 577129092 | 30/05/2013 | 750.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. RENTISTICO           | CONCEPTO                                                     | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| 12 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC | 30.000.00    | 360.000.00   |
|                            |                                                              |              | \$360.000.00 |

SON: \*\*TRESCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-133991- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:06:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 80

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 30 de 2013 - 16:05:54