

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 406**

51 Int. Cl.:

C07K 14/11 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06826359 .9**

96 Fecha de presentación: **19.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1945659**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54

Título: **Virus de la gripe capaces de infectar a cánidos, usos de los mismos**

30

Prioridad:

19.10.2005 US 728449 P

29.12.2005 US 754881 P

14.01.2006 US 759162 P

23.01.2006 US 761451 P

03.03.2006 US 779080 P

21.04.2006 US 409416

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73

Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INCORPORATED (33.3%)**

223 Grinter Hall

Gainesville, Florida 32611, US;

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES (33.3%) y
CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
(33.3%)**

72

Inventor/es:

CRAWFORD, PATTI C.;

GIBBS, PAUL J.;

DUBOVI, EDWARD J.;

DONIS, RUBEN O.;

KATZ, JACQUELINE;

KLIMOV, ALEXANDER I.;

LAKSHMANAN, NALLAKANNU P.;

LUM, MELISSA ANNE;

GOOVAERTS, DANIEL GHISLENA EMIEL;

MELLENCAMP, MARK WILLIAM;

CASTLEMAN, WILLIAM L. y

COX, NANCY J.

74

Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 393 406 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus de la gripe capaces de infectar a cánidos, usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

La “tos de las perreras” o traqueobronquitis infecciosa (ITB) es una infección respiratoria aguda, contagiosa en perros caracterizada principalmente por tos (Ford *et al.*, 1998). La ITB canina se considera una de las enfermedades respiratorias infecciosas más prevalentes en perros en todo el mundo, y sus brotes pueden alcanzar proporciones epidémicas cuando los perros se alojan en ambientes de población de alta densidad tales como perreras. La mayoría de los brotes se deben a contacto directo entre perros o aerosolización de secreciones respiratorias (Ford *et al.*, 1998). Las señales clínicas están provocadas por infección con uno o una combinación de agentes bacterianos y virales que colonizan el epitelio del tracto respiratorio superior e inferior. El virus paragripal canino (CPIV) y la bacteria *Bordetella bronchiseptica* son los organismos más habituales aislados de perros afectados, pero varios otros virus, tales como virus del moquillo canino (CDV) y adenovirus caninos 1 y 2 (CAV-1, CAV-2), junto con bacterias tales como *Streptococcus sp.*, *Pasteurella multocida* y *Escherichia coli*, pueden influir en el desarrollo clínico y resultado (Ford *et al.*, 1998). Aunque los brotes se producen más eficaz y rápidamente en poblaciones de alta densidad con alta morbilidad, son poco habituales las infecciones respiratorias complicadas y muerte. Aunque puede desarrollarse neumonía bacteriana secundaria con peligro para la vida, la mayoría de los casos de ITB son autolimitantes y se resuelven sin ningún tratamiento (Ford *et al.*, 1998).

En julio de 1992, una infección respiratoria que se suponía que era “tos de las perreras” se hizo epidémica en varios canódromos en Nueva Inglaterra, Florida, Virginia Occidental, Wisconsin, Kansas, Colorado, Oklahoma y Arizona. De acuerdo con los veterinarios, la mayoría de los perros afectados tenían una tos suave que se resolvió, pero más de doce galgos desarrollaron una neumonía hemorrágica aguda seguida de muerte rápida (Greyhound Daily News, 1999).

Desde finales de 1998 hasta principios de 1999, se produjeron varios brotes de “tos de las perreras” en perreras de galgos de carrera por todo el país, dando como resultado el cierre obligatorio de pistas y la cuarentena de todos los galgos de carrera en los Estados Unidos durante varias semanas (Greyhound Daily News, 1999). En una pista en Florida (Palm Beach Kennel Club), se registró tos en casi el 40% de la población de perros en un solo día (comunicación personal del Dr. William Duggar). De forma similar al brote de 1992, la tos se resolvió en la mayoría de los galgos, pero 10 perros en Florida murieron de un síndrome de neumonía hemorrágica no característico de la “tos de las perreras” (Putnam, 1999).

En marzo-abril de 2003, se produjo otro brote de “tos de las perreras” en canódromos en el Este de los Estados Unidos. Se cree que el brote se originó en perreras de cuatro pistas en Florida y provocó la suspensión de carreras y la cuarentena de los perros durante casi tres semanas. Casi el 25% de los perros en la pista West Palm Beach se vieron afectados, aunque casi el 50% de los 1400 perros en Derby Lane en San Petersburgo desarrollaron tos. De nuevo, la mayoría de los perros se recuperó, pero varios perros han muerto de la infección respiratoria. El impacto económico estimado del brote respiratorio en la pista de Derby Lane solamente fue de 2 millones de dólares.

No existen informes publicados que documenten la etiología o clinicopatología de la epidemia de “tos de las perreras” en perreras de canódromos en 1992, 1998-1999 o 2003. La suposición ha sido que las infecciones se debieron a “CPIV y/o *B. brochiseptica*, las dos causas más habituales de tos de las perreras. Informaciones infundadas tales como sitios web han atribuido las neumonías hemorrágicas letales notificadas en algunos de los perros con tos a infección con *Streptococcus equi* subespecie *zooeidemicus* β-hemolítico, y hacen referencia al síndrome como “choque tóxico estreptocócico canino”.

La transmisión del virus de una especie hospedadora a otra es una característica crucial de la ecología y epidemiología del virus de la gripe (Webster, 1998). Son posibles dos mecanismos básicos de transmisión entre especies de virus de la gripe (Webster *et al.*, 1992; Lipatov *et al.*, 2004). Uno es la transferencia directa de un virus esencialmente inalterado de una especie a otra. Los ejemplos de este mecanismo incluyen las infecciones humanas recientes con el subtipo H5N1 de virus de la gripe aviar (Subbarao *et al.*, 1998; Peiris *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2004) y posiblemente la pandemia de 1918, conocida como gripe española (Reid *et al.*, 2004). El segundo mecanismo es una consecuencia de la naturaleza segmentada del genoma de la gripe. La infección conjunta de un hospedador con virus de diferentes especies puede dar como resultado una nueva mezcla de los genes virales segmentados y la generación de un recombinante con la capacidad de infectar a otras especies. Por ejemplo, virus nuevos generados por redistribución génica entre virus de la gripe aviar y humana dieron como resultado las pandemias de gripe humana en 1957 y 1968 (Webster *et al.*, 1992; Lipatov *et al.*, 2004; Kawaoka *et al.*, 1989).

La mayoría de las transmisiones directas de virus de la gripe inalterados de la especie hospedadora natural a diferentes especies son acontecimientos terminales debido a que no se produce transmisión prolongada entre individuos de la nueva especie. Son necesarias múltiples interacciones virus-hospedador para replicación y transmisión horizontal y proporcionan una barrera formidable a la perpetuación de virus de la gripe en el nuevo hospedador (Webby *et al.*, 2004). Por lo tanto, el establecimiento de nuevos linajes específicos de hospedador de

virus de la gripe es poco habitual y sólo se ha producido en aves domésticas, cerdos, caballos y seres humanos (Webster *et al.*, 1992; Lipatov *et al.*, 2004).

5 Debido a la naturaleza grave de la infección por virus de la gripe, sigue existiendo la necesidad de métodos para diagnosticar, prevenir y tratar la infección por virus de la gripe.

Breve resumen de la invención

10 La invención objeto concierne a un virus de la gripe aislado que es capaz de infectar cánidos y provocar enfermedad respiratoria en el cánido.

Específicamente, la invención es la siguiente:

15 1. Un virus de la gripe canina aislado que es capaz de infectar a un animal cánido, en el que dicho virus de la gripe comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de hemaglutinina (HA) que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 78, o una secuencia madura de la misma en la que se ha retirado la secuencia señal de 16 aminoácidos N-terminal de la secuencia de longitud completa.

20 2. El virus de la gripe de acuerdo con 1, en el que dicho virus de la gripe comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene el 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76.

25 3. El virus de la gripe de acuerdo con 1, en el que dicho polipéptido de HA de dicho aislado viral comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 78.

30 4. El virus de la gripe de acuerdo con 1, en el que dicho virus de la gripe comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, o dicho polinucleótido tiene el 98% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77.

5. El virus de la gripe de acuerdo con 1, en el que dicho virus de la gripe está inactivado o atenuado.

35 6. Una composición que comprende un inmunógeno de un virus de la gripe de 1, en la que dicho inmunógeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe que es capaz de infectar a un animal cánido, y en la que dicho inmunógeno comprende:

- 40 (a) un polipéptido de HA como se ha definido en 1 o 3; y/o
(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido de HA como se ha definido en 1 o 3.

45 7. La composición de acuerdo con 6, en la que dicho inmunógeno comprende virus completos sin células, o una parte de los mismos; un polinucleótido viral; una proteína viral; un polipéptido o péptido viral; una célula infectada por virus; una construcción basada en vector viral recombinante; un virus redistribuido; o ácido nucleico desnudo de dicho virus.

50 8. La composición de acuerdo con 7, en la que dicha proteína, polipéptido o péptido viral comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene el 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76.

55 9. La composición de acuerdo con 7, en la que dicho polinucleótido viral codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene el 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76.

60 10. La composición de acuerdo con 7, en la que dicho polinucleótido viral comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, o un fragmento funcional de la misma.

11. Una vacuna de gripe canina, en la que la vacuna comprende:

65 una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno de al menos un virus de la gripe de 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable,

en la que dicho antígeno comprende:

- (a) un polipéptido de HA como se ha definido en 1 o 3; y/o
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido de HA como se ha definido en 1 o 3.

12. La vacuna de acuerdo con 11, en la que el antígeno o los antígenos del virus comprenden uno o varios virus inactivados.

13. La vacuna de acuerdo con 11, en la que el antígeno o los antígenos del virus comprenden uno o varios virus atenuados vivos.

14. Un polinucleótido aislado que comprende todo o parte de un segmento genómico o gen de un virus de la gripe de 1, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de HA como se ha definido en 1 o 3.

15. El polinucleótido de acuerdo con 14, en el que dicho polinucleótido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

16. Una construcción de expresión polinucleotídica que comprende un polinucleótido de 14.

17. Un polipéptido de HA aislado codificado por un polinucleótido de 14.

18. El polipéptido de acuerdo con 17, en el que dicho polipéptido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los beneficios de la invención de los solicitantes resultarán evidentes para un experto en la materia a partir de la lectura de la presente memoria descriptiva.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B muestran relaciones filogenéticas entre los genes de hemaglutinina. **La Figura 1A** muestra un árbol de genes de HA de aislados caninos, humanos, aviares, porcinos y equinos representativos, incluyendo A/Budgerigar/Hokkaido/1/77 (H4) como grupo externo. **La Figura 1B** muestra un árbol de los genes de HA de virus de la gripe canina con genes de HA equinos contemporáneos y más antiguos, usando A/Pato/Ucrania/63 (H3) como grupo externo. Los árboles filogenéticos se infirieron a partir de secuencias de nucleótidos por el método de unión de vecinos y se muestran valores de análisis bootstrap $\geq 90\%$. La barra indica el número de cambios de nucleótidos por unidad de longitud de las ramas horizontales del árbol.

Las Figuras 2A-2B muestran la detección inmunohistoquímica del antígeno H3 de la gripe en los pulmones. Las secciones tisulares de pulmón se exploraron con un anticuerpo monoclonal de ratón para hemaglutinina H3 y se detectó unión por reacción de inmunoperoxidasa (precipitado marrón). **La Figura 2A** muestra epitelio bronquial de un galgo con enfermedad espontánea. Se detectó antígeno viral H3 en citoplasma de células epiteliales bronquiales y en macrófagos en los lúmenes de las vías respiratorias y en espacios alveolares. **La Figura 2B** muestra epitelio bronquial de un perro 5 días después de inoculación con A/canino/Florida/43/2004 (H3N8). Se detectó antígeno viral H3 en citoplasma de células epiteliales bronquiales. Barra de escala, 66 μm .

La Figura 3 muestra los cambios histológicos característicos en los bronquios de galgos que murieron de neumonía hemorrágica asociada con infección por virus de la gripe. Los tejidos se tiñen con hematoxilina y eosina. Panel superior: bronquio normal con células epiteliales ciliadas, células mucosas y células basales. Panel inferior: bronquio de un galgo con gripe espontánea. Hay necrosis y erosión de las células epiteliales ciliadas bronquiales. Barra de escala, 100 μm .

Las Figuras 4A-4B muestran relaciones filogenéticas entre los genes de hemaglutinina H3. **La Figura 4A** muestra un árbol filogenético de los genes de HA de virus de la gripe canina con genes de HA equinos contemporáneos y más antiguos. **La Figura 4B** muestra un árbol filogenético de la proteína HA de virus de la gripe canina con HA equina contemporánea y más antigua. Los árboles filogenéticos se infirieron a partir de secuencias genéticas o de aminoácidos por el método de unión de vecinos y se muestran los valores de análisis bootstrap $\geq 80\%$. La barra indica el número de cambios de aminoácidos por unidad de longitud de las ramas horizontales del árbol.

La Figura 5 muestra proteína H3 de virus de la gripe en células epiteliales de bronquios y glándulas bronquiales en pulmones de perros que murieron de neumonía asociada con infección por virus de la gripe. Paneles superiores: Erosión de células epiteliales bronquiales ciliadas en bronquios. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina. Paneles inferiores: proteína H3 del virus de la gripe en el citoplasma de células epiteliales bronquiales (izquierda) y de glándulas bronquiales (derecha). Los tejidos se tiñeron con un anticuerpo monoclonal para H3 de la gripe detectado por reacción de inmunoperoxidasa (precipitado marrón) y se contratiñeron con hematoxilina.

Las Figuras 6A-6D muestran representaciones de amplificación de genes de H3 y de matriz (**Figura 6A** y **Figura 6B**) obtenidas a partir de la amplificación de patrones de ARN transcritos *in vitro* diluidos en serie 10 veces. Se construyeron curvas patrón de genes de H3 y de matriz (**Figura 6C** y **Figura 6D**) representando el

logaritmo de las concentraciones de ARN de partida frente al ciclo umbral (Ct) obtenido de cada dilución.

La **Figura 7** muestra que la sensibilidad de Directigen Flu A se ensayó con reservas de virus diluido en serie 10 veces que incluían A/Wyoming/3/2003 y A/canino/FL/242/2003. El triángulo púrpura indica resultado positivo.

5 Breve descripción de las secuencias

- SEC ID Nº: 1** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína PB2.
- SEC ID Nº: 2** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 1.
- 10 **SEC ID Nº: 3** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína PB 1.
- SEC ID Nº: 4** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 3.
- SEC ID Nº: 5** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína PA.
- 15 **SEC ID Nº: 6** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 5.
- SEC ID Nº: 7** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína NS.
- SEC ID Nº: 8** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 7.
- 20 **SEC ID Nº: 9** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína NP.
- SEC ID Nº: 10** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 9.
- SEC ID Nº: 11** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína NA.
- 25 **SEC ID Nº: 12** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 11.
- SEC ID Nº: 13** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína MA.
- SEC ID Nº: 14** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 13.
- SEC ID Nº: 15** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Florida/43/04) que codifica una proteína HA.
- 30 **SEC ID Nº: 16** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 15.
- SEC ID Nº: 17** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (FL/242/03) que codifica una proteína PB2.
- SEC ID Nº: 18** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 17.
- 35 **SEC ID Nº: 19** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (FL/242/03) que codifica una proteína PB 1.
- SEC ID Nº: 20** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 19.
- SEC ID Nº: 21** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (F/242/03) que codifica una proteína PA.
- 40 **SEC ID Nº: 22** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 21.
- SEC ID Nº: 23** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (F/242/03) que codifica una proteína NS.
- SEC ID Nº: 24** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 23.
- 45 **SEC ID Nº: 25** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (F/242/03) que codifica una proteína NP.
- SEC ID Nº: 26** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 25.
- SEC ID Nº: 27** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (FL/242/03) que codifica una proteína NA.
- 50 **SEC ID Nº: 28** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 27.
- SEC ID Nº: 29** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (FL/242/03) que codifica una proteína MA.
- SEC ID Nº: 30** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 29.
- 55 **SEC ID Nº: 31** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (FL/242/03) que codifica una proteína HA.
- SEC ID Nº: 32** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 31.
- SEC ID Nº: 33** es la forma madura de la proteína HA mostrada en SEC ID Nº: 16 en la que se ha retirado la secuencia señal de 16 aminoácidos N-terminal.
- SEC ID Nº: 34** es la forma madura de la proteína HA mostrada en SEC ID Nº: 32 en la que se ha retirado la secuencia señal de 16 aminoácidos N-terminal.
- 60 **SEC ID Nº: 35** es un oligonucleótido.
- SEC ID Nº: 36** es un oligonucleótido.
- SEC ID Nº: 37** es un oligonucleótido.
- SEC ID Nº: 38** es un oligonucleótido.
- SEC ID Nº: 39** es un oligonucleótido.
- 65 **SEC ID Nº: 40** es un oligonucleótido.
- SEC ID Nº: 41** es un oligonucleótido.
- SEC ID Nº: 42** es un oligonucleótido.

- SEC ID Nº: 43** es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 44 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 45 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 46 es un oligonucleótido.
5 **SEC ID Nº: 47** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína PB2.
SEC ID Nº: 48 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 47.
SEC ID Nº: 49 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína PB1.
10 **SEC ID Nº: 50** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 49.
SEC ID Nº: 51 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína PA.
SEC ID Nº: 52 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 51.
15 **SEC ID Nº: 53** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína NS.
SEC ID Nº: 54 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 53.
SEC ID Nº: 55 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína NP.
20 **SEC ID Nº: 56** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 55.
SEC ID Nº: 57 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína NA.
SEC ID Nº: 58 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 57.
SEC ID Nº: 59 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína MA.
25 **SEC ID Nº: 60** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 59.
SEC ID Nº: 61 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Miami/2005) que codifica una proteína HA.
SEC ID Nº: 62 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 61.
30 **SEC ID Nº: 63** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína PB2.
SEC ID Nº: 64 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 63.
SEC ID Nº: 65 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína PB1.
35 **SEC ID Nº: 66** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 65.
SEC ID Nº: 67 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína PA.
SEC ID Nº: 68 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 67.
SEC ID Nº: 69 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína NS.
40 **SEC ID Nº: 70** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 69.
SEC ID Nº: 71 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína NP.
SEC ID Nº: 72 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 71.
45 **SEC ID Nº: 73** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína NA.
SEC ID Nº: 74 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 73.
SEC ID Nº: 75 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína MA.
50 **SEC ID Nº: 76** es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 75.
SEC ID Nº: 77 es una secuencia de nucleótidos de un virus de la gripe canina (Jacksonville/2005) que codifica una proteína HA que puede usarse de acuerdo con la presente invención.
SEC ID Nº: 78 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID Nº: 77.
SEC ID Nº: 79 es un oligonucleótido.
55 **SEC ID Nº: 80** es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 81 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 82 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 83 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 84 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 85 es un oligonucleótido.
60 **SEC ID Nº: 86** es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 87 es un oligonucleótido.
SEC ID Nº: 88 es un oligonucleótido.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere a un virus de la gripe aislado que es capaz de infectar cánidos y provocar enfermedad respiratoria. Un virus de la gripe puede comprender un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78 o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma. El polinucleótido puede comprender la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77 o un fragmento o variante de la misma. El virus de la gripe puede tener un subtipo de HA de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 y H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16 o un subtipo NA de N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. En una realización específica, un virus de la gripe de la presente invención es un subtipo H3. El virus puede aislarse de perros infectados y cultivarse en células o huevos de acuerdo con métodos descritos en este documento. En una realización ejemplar, el virus de la gripe es un virus de la gripe A.

La presente descripción también se refiere a polinucleótidos que comprenden todo o parte de un gen o genes o un segmento genómico de un virus de la gripe de la presente invención. Un polinucleótido puede comprender un gen de hemaglutinina de la gripe (HA), gen de neuraminidasa (NA), gen de nucleoproteína (NP), gen de proteína de la matriz (MA o M), gen de proteína básica de polimerasa (PB), gen de proteína ácida de polimerasa (PA), gen de proteína no estructural (NS) o un fragmento o variante funcional de cualquiera de estos genes. En una realización específica, un polinucleótido de la invención comprende el gen de hemaglutinina (HA). En la descripción, el gen de HA codifica una proteína de hemaglutinina que tiene uno o más de los siguientes: una serina en la posición 83; una leucina en la posición 222; una treonina en la posición 328; y/o una treonina en la posición 483, frente a la secuencia de aminoácidos de la secuencia consenso de H3 equina. El gen de HA puede codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16, 32, 62 o 78 o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma. El gen de HA puede comprender una secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 15, 31, 61 o 77.

Un polinucleótido puede codificar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78 o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma. El polinucleótido puede codificar la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, comprender la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, respectivamente, o una secuencia que codifica un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78. Por lo tanto, la descripción objeto se refiere a secuencias polinucleotídicas que comprenden la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, o un fragmento o variante, incluyendo una variante degenerada, de cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77. Los polinucleótidos de la descripción pueden comprender: Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 3; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 5; Nucleótidos 1-657 de SEC ID N°: 7; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 9; Nucleótidos 1-1410 de SEC ID N°: 11; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 13; Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 15; Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 19; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 21; Nucleótidos 1-657 de SEC ID N°: 23; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 25; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 29; Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 31; Nucleótidos 1-2277 de SEC ID N°: 47; Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 49; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 51; Nucleótidos 1-690 de SEC ID N°: 53; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 55; Nucleótidos 1-1410 de SEC ID N°: 57; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 59; Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 61; Nucleótidos 1-2277 de SEC ID N°: 63; Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 65; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 67; Nucleótidos 1-690 de SEC ID N°: 69; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 71; Nucleótidos 1-1410 de SEC ID N°: 73; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 75; y Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 77. También se han depositado secuencias de nucleótidos y aminoácidos de secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas virales contempladas dentro del alcance de la presente descripción en GenBank con N° de acceso DQ124147 a DQ124161 y DQ124190.

La descripción objeto también se refiere a polipéptidos codificados por polinucleótidos de un virus de la gripe. La descripción objeto también se refiere a fragmentos funcionales y/o inmunogénicos y variantes de los polipéptidos objeto. Los polipéptidos contemplados incluyen proteína HA, proteína NA, proteína NS, nucleoproteína, proteína básica de polimerasa, proteína ácida de polimerasa, y proteína de la matriz de un virus de la gripe. Un polipéptido de la descripción puede tener una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma.

La descripción objeto también se refiere a construcciones de expresión de polinucleótidos que comprenden una secuencia polinucleotídica. Una construcción de expresión de la descripción puede comprender una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,

68, 70, 72, 74, 76 o 78, o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma. El polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78 puede comprender la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, respectivamente, o una secuencia que codifica un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78. Por lo tanto, la descripción objeto se refiere a construcciones de expresión que comprenden una secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, o un fragmento o variante, incluyendo una variante degenerada, de cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77. Una construcción de expresión de la presente descripción posibilita la sobreexpresión de un polinucleótido unido operativamente de la descripción.

Las construcciones de expresión generalmente incluyen elementos reguladores que son funcionales en la célula hospedadora deseada en la que debe expresarse la construcción de expresión. Por lo tanto, un experto habitual en la materia puede seleccionar elementos reguladores para su uso en, por ejemplo, células hospedadoras humanas, células hospedadoras de mamífero, células hospedadoras de insectos, células hospedadoras de levadura, células hospedadoras bacterianas y células hospedadoras vegetales. En una realización, los elementos reguladores son elementos que son funcionales en células caninas. Los elementos reguladores incluyen promotores, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias de terminación de la traducción, potenciadores y elementos de poliadenilación. Como se usa en este documento, la expresión "construcción de expresión" se refiere a una combinación de secuencias de ácido nucleico que posibilita la transcripción de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente. Como se usa en este documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición de los componentes descritos en la que los componentes están en una relación que les permite actuar de la manera deseada. En general, los componentes unidos operativamente están en una relación contigua.

Una construcción de expresión puede comprender una secuencia promotora unida operativamente con una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de la invención. Los promotores pueden incorporarse en un polinucleótido usando técnicas convencionales conocidas en este campo. Pueden usarse múltiples copias de promotores o múltiples promotores en una construcción de expresión. Un promotor puede situarse aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción en la construcción de expresión que del sitio de inicio de la transcripción en su ambiente genético natural. Se permite cierta variación de esta distancia sin reducción sustancial de la actividad promotora. Típicamente se incluye un sitio de inicio de la transcripción en la construcción de expresión. Preferiblemente, el promotor asociado con una construcción de expresión de la invención posibilita la sobreexpresión de un polinucleótido unido operativamente de la invención.

Los promotores para su uso con una construcción de la expresión en células eucariotas pueden ser de origen viral o celular. Los promotores virales incluyen, pero sin limitación, promotores de genes de citomegalovirus (CMV), promotores tempranos o tardíos de SV40, o promotores de genes del virus del sarcoma de Rous (RSV). Los promotores de origen celular incluyen, pero sin limitación, promotor del gen de desmina y promotor del gen de actina. Los promotores adecuados para su uso con una construcción de expresión de la invención en células de levadura incluyen, pero sin limitación, promotor de 3-fosfoglicerato quinasa, promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, promotor de metalotioneína, promotor de alcohol deshidrogenasa-2 y promotor de hexoquinasa.

Si la construcción de la expresión debe proporcionarse o introducirse en una célula vegetal, entonces pueden usarse promotores virales vegetales, tales como, por ejemplo, un promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (incluyendo el promotor de 35S de CaMV potenciado (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.106.739 y An, 1997)) o un promotor de 19S de CaMV. Otros promotores que pueden usarse para construcciones de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, promotor prolifera, promotor Ap3, promotores de choque térmico, promotor de ADN-T 1' o 2' de *A. tumefaciens*, promotor de poligalacturonasa, promotor de chalcona sintasa A (CHS-A) de petunia, promotor de PR-1 del tabaco, promotor de ubiquitina, promotor de actina, promotor del gen *alcA*, promotor de *pin2* (Xu *et al.*, 1993), promotor de *Wipl* del maíz, promotor del gen *trpA* del maíz (Patente de Estados Unidos N° 5.626.136), promotor del gen *CDPK* del maíz y también puede usarse promotor de RUBISCO SSU (Patente de Estados Unidos N° 5.034.322). Pueden usarse promotores específicos de raíz, tales como cualquiera de las secuencias promotoras descritas en la Patente de Estados Unidos N° 6.455.760 o Patente de Estados Unidos N° 6.696.623 o en las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas N° 20040078841; 20040067506; 20040019934; 20030177536; 20030084486; o 20040123349, con una construcción de expresión. También se contemplan promotores constitutivos (tales como el promotor de CaMV, ubiquitina, actina o NOS), promotores regulados por el desarrollo y promotores inducibles (tales como los promotores que pueden inducirse por calor, luz, hormonas o compuestos químicos) para su uso con construcciones de expresión de polinucleótidos. También pueden usarse promotores específicos de tejidos, por ejemplo, promotores específicos de fruta, tales como el promotor E8 del tomate (número de acceso: AF515784; Good *et al.*, (1994)). También pueden usarse promotores específicos de semilla tales como el promotor del gen de faseolina β (por ejemplo, de alubia) o un gen de glicina (por ejemplo, de soja) y otros.

Para la expresión en sistemas procariotas, una construcción de expresión puede comprender promotores tales como, por ejemplo, promotor de fosfatasa alcalina, promotor de triptófano (*trp*), promotor lambda P_L, promotor de β-lactamasa, promotor de lactosa, promotor de *phoA*, promotor de T3, promotor de T7 o promotor de *tac* (de Boer *et al.*, 1983).

5 Las construcciones de expresión pueden contener opcionalmente una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de terminación de la traducción, una secuencia que codifique un péptido señal y/o elementos potenciadores. Pueden obtenerse típicamente regiones de terminación de la transcripción de la región no traducida 3' de una secuencia de gen viral o eucariota. Las secuencias de terminación de la transcripción pueden situarse
10 corriente abajo de una secuencia codificante para proporcionar una terminación eficaz. Una secuencia de péptido señal es una secuencia de aminoácidos corta típicamente presente en el extremo amino terminal de una proteína que es responsable del traslado de un polipéptido maduro unido operativamente a una amplia serie de destinos celulares postraduccionales, que varían desde un compartimento de orgánulo específico a sitios de acción proteica y el ambiente extracelular. Se contempla la dirección de productos génicos a un destino celular y/o extracelular deseado a través del uso de una secuencia de péptido señal unida operativamente para su uso con los polipéptidos de la invención. Son potenciadores clásicos elementos de acción en *cis* que aumentan la transcripción génica y también pueden incluirse en la construcción de expresión. Se conocen en la técnica elementos potenciadores clásicos e incluyen, pero sin limitación, el elemento potenciador de 35S de CaMV, el elemento potenciador de promotor temprano de citomegalovirus (CMV) y el elemento potenciador de SV40. También se conocen en la técnica
15 elementos potenciadores mediados por intrón que potencian la expresión génica. Estos elementos deben estar presentes dentro de la región transcrita y dependen de la orientación.

En la construcción de expresión también pueden incluirse secuencias de ADN que dirigen la poliadenilación del ARNm transcrito a partir de la construcción de expresión, e incluyen, pero sin limitación, una señal de octopina
25 sintasa o nopalina sintasa.

Las construcciones de expresión también pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables dominantes, incluyendo, por ejemplo, genes que codifican resistencia a antibióticos y/o resistencia a herbicidas para seleccionar células transformadas. Los genes de resistencia a antibióticos pueden proporcionar resistencia a uno o más de los
30 siguientes antibióticos: higromicina, kanamicina, bleomicina, G418, estreptomycin, paromomicina, neomicina y espectinomicina. Puede proporcionarse resistencia a kanamicina por neomicina fosfotransferasa (NPT II). Los genes de resistencia a herbicidas pueden proporcionar resistencia a fosfotricina acetiltransferasa o glifosato. Otros marcadores usados para exploración de transformación de células incluyen, pero sin limitación, genes que codifican β-glucuronidasa (GUS), β-galactosidasa, luciferasa, nopalina sintasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP) o GFP potenciada (Yang *et al.*, 1996).

La presente descripción también se refiere a vectores polinucleotídicos que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de la descripción. Pueden incluirse sitios de enzimas de restricción únicos en los extremos 5' y 3' de una construcción de expresión o polinucleótido de la invención para permitir la
40 inserción en un vector polinucleotídico. Como se usa en este documento, el término "vector" se refiere a cualquier elemento genético, incluyendo por ejemplo, plásmidos, cósmidos, cromosomas, fago, virus y similares, con capacidad de replicación cuando se asocia con elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias polinucleotídicas entre células. Los vectores contienen una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en una célula hospedadora seleccionada. Están disponibles varios vectores para expresión y/o clonación, e incluyen, pero sin limitación, pBR322, serie pUC, serie M13, serie pGEM y vectores pBLUESCRIPT (Stratagene, La
45 Jolla, CA y Promega, Madison, WI).

La presente descripción también se refiere a sondas y cebadores oligonucleotídicos, tales como cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que pueden hibridar con una secuencia codificante o no codificante de un polinucleótido. Pueden usarse sondas oligonucleotídicas en métodos para detectar secuencias de ácido nucleico del virus de la gripe. Pueden usarse cebadores oligonucleotídicos en métodos de PCR y otros métodos que implican
50 amplificación de ácidos nucleicos. Una sonda o cebador puede hibridar con un polinucleótido en condiciones rigurosas. Las sondas y cebadores pueden comprender opcionalmente un marcador detectable o molécula indicadora, tales como moléculas fluorescentes, enzimas, restos radiactivos y similares. Las sondas y cebadores pueden ser de cualquier longitud adecuada para el método o ensayo en el que se están empleando. Típicamente, las sondas y cebadores serán de 10 a 500 o más nucleótidos de longitud. Se contemplan sondas y cebadores que son de 10 a 20, de 21 a 30, de 31 a 40, de 41 a 50, de 51 a 60, de 61 a 70, de 71 a 80, de 81 a 90, de 91 a 100 o 101 o más nucleótidos de longitud. Las sondas y cebadores son de cualquiera de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. Las sondas y cebadores pueden tener
60 identidad de secuencia de nucleótidos completa (100%) con la secuencia polinucleotídica, o la identidad de secuencia puede ser menor del 100%. Por ejemplo, la identidad de secuencia entre una sonda o cebador y una secuencia puede ser del 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70% o cualquier otro porcentaje de identidad de secuencia, siempre que la sonda o cebador pueda hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido. Las sondas y cebadores ejemplificados de la invención incluyen los que tienen
65 la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41, SEC ID N°: 42, SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45 y

SEC ID N°: 46, o un fragmento o variante funcional de cualquiera de las SEC ID N°: 35-46.

5 Como se usa en este documento, las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un desoxirribonucleótido, ribonucleótido o un polímero mixto de desoxirribonucleótido y ribonucleótido en forma mono o bicatenaria y, a no ser que se limite de otro modo, abarcarían análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden actuar de una manera similar como nucleótidos de origen natural. Las secuencias polinucleotídicas incluyen la secuencia de cadena de ADN que puede transcribirse a ARN y la cadena de ARN que puede traducirse a proteína. También se contempla dentro del alcance de la invención la secuencia complementaria de cualquier ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido de la presente invención. Las secuencias polinucleotídicas también incluyen tanto secuencias de longitud completa como secuencias más cortas derivadas de las secuencias de longitud completa. La presente descripción también abarca los polinucleótidos que son complementarios en secuencia a los polinucleótidos descritos en este documento. Los polinucleótidos y polipéptidos pueden proporcionarse en forma purificada o aislada.

15 Debido a la degeneración del código genético, una diversidad de secuencias polinucleotídicas diferentes pueden codificar un polipéptido. Se describe una tabla que muestra todos los tripletes codónicos posibles (y en los que U también significa T) y el aminoácido codificado por cada codón en Lewin (1985). Además, está dentro de la experiencia de una persona entrenada en la técnica crear secuencias polinucleotídicas alternativas que codifican los mismos, o esencialmente los mismos, polipéptidos de la descripción. Estas secuencias polinucleotídicas variantes y alternativas degeneradas están dentro del alcance de la descripción. Como se usa en este documento, las referencias a "esencialmente la misma" secuencia se refiere a las secuencias que codifican sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no alteran materialmente la actividad funcional y/o inmunogénica del polipéptido codificado por los polinucleótidos de la descripción.

25 La descripción también se refiere a variantes de los polinucleótidos de la descripción que codifican polipéptidos de la descripción. Las secuencias variantes incluyen las secuencias en las que uno o más nucleótidos de la secuencia se han sustituido, suprimido y/o insertado. Los nucleótidos que pueden sustituir nucleótidos naturales de ADN tienen un resto de base que puede incluir, pero sin limitación, inosina, 5-fluoroacilo, 5-bromouracilo, hipoxantina, 1-metilguanina, 5-metilcitosina y bases tritiladas. El resto de azúcar del nucleótido en una secuencia también puede modificarse e incluye, pero sin limitación, arabinosa, xilulosa y hexosa. Además, las bases de adenina, citosina, guanina, timina y uracilo de los nucleótidos pueden modificarse con acetilo, metilo y/o grupos tio. Pueden prepararse secuencias que contienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de nucleótidos y ensayarse usando técnicas convencionales conocidas en la materia.

35 También se contempla dentro del alcance de la descripción la sustitución de aminoácidos distintos de los ejemplificados específicamente o presentes de forma natural en un polipéptido de la descripción. Por ejemplo, aminoácidos no naturales pueden sustituir a los aminoácidos de un polipéptido, siempre que el polipéptido que tiene los aminoácidos sustituidos conserve sustancialmente la misma actividad funcional que el polipéptido en el que no se han sustituido los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, pero sin limitación, ornitina, citrulina, hidroxiprolina, homoserina, fenilglicina, taurina, yodotirosina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-amino butírico, ácido γ -amino butírico, ácido ϵ -amino hexanoico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, norleucina, norvalina, sarcosina, homocitrulina, ácido cisteico, τ -butilglicina, τ -butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil aminoácidos, C-metil aminoácidos, N-metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Los aminoácidos no naturales también incluyen aminoácidos que tienen grupos laterales derivatizados. Además, cualquiera de los aminoácidos en la proteína puede ser de la forma D (dextrógira) o L (levógira). Se contemplan variantes alélicas de una secuencia proteica de un polipéptido.

50 Los aminoácidos pueden categorizarse generalmente en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones conservativas por las que un polipéptido de la presente invención que tiene un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido de la misma clase quedan dentro del alcance de la descripción siempre que el polipéptido que tenga la sustitución aún conserve sustancialmente la misma actividad funcional que el polipéptido que no tiene la sustitución. Dentro del alcance de la descripción se contemplan polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia. La Tabla 11 posterior proporciona una lista de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase. En la Tabla 12 se definen abreviaturas de aminoácidos de una letra.

60 Pueden generarse fragmentos y variantes de polipéptidos de virus de la gripe usando métodos convencionales conocidos en la técnica y ensayarse con respecto a la presencia de función o inmunogenicidad usando técnicas convencionales conocidas en este campo. Por ejemplo, para ensayar fragmentos y/o variantes de un polipéptido de neuraminidasa de la invención, puede ensayarse la actividad enzimática. Por lo tanto, un experto habitual en la materia puede preparar y ensayar fácilmente fragmentos y variantes de un polipéptido y determinar si el fragmento o variante conserva actividad en relación con el polipéptido de longitud completa o uno no variante.

65 Los polinucleótidos y polipéptidos contemplados también pueden definirse con respecto a intervalos de identidad y/o similitud más particulares con las secuencias de la invención ejemplificadas específicamente en este documento. La

5 secuencia de identidad típicamente será mayor del 60%, preferiblemente mayor del 75%, más preferiblemente mayor del 80%, aún más preferiblemente mayor del 90% y puede ser mayor del 95%. La identidad y/o similitud de una secuencia puede ser del 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% en comparación con una secuencia ejemplificada en este documento. A no ser que se especifique de otro modo, como se usa en este documento el porcentaje de identidad y/o similitud de secuencia de dos secuencias puede determinarse usando el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), modificado como en Karlin y Altschul (1993). Un algoritmo tal se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (1990). Pueden realizarse búsquedas de BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener 10 secuencias con el porcentaje de identidad de secuencia deseado. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede usarse BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.* (1997). Cuando se utilizan programas BLAST y BLAST con huecos, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (NBLAST y XBLAST). Véase sitio web NCBI/NIH.

15 La descripción también contempla las moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias que son suficientemente homólogas de las secuencias polinucleotídicas ejemplificadas en este documento para permitir la hibridación con esa secuencia en condiciones rigurosas convencionales y métodos convencionales (Maniatis *et al.*, 1982). Como se usa en este documento, condiciones "rigurosas" para hibridación se refiere a condiciones en las que la hibridación se lleva a cabo típicamente durante una noche a 20-25 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN en SSPE 6x, solución de Denhardt 5x, SDS 0,1%, ADN desnaturalizado 0,1 mg/ml. La temperatura de fusión, T_m, se describe por la siguiente fórmula (Beltz *et al.*, 1983):

$T_m = 81,5 C + 16,6 \text{ Log}[Na^+] + 0,41(\%G+C - 0,61 (\% \text{ de formamida}) - 600 / \text{longitud de la doble cadena en pares de bases.}$

25 Los lavados se llevan a cabo típicamente como sigue:

- 30 (1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en SSPE 1x, SDS 0,1% (lavado de baja rigurosidad).
 (2) Una vez a T_m-20 C durante 15 minutos en SSPE 0,2x, SDS 0,1% (lavado de rigurosidad moderada).

35 La descripción también se refiere a proteínas y péptidos virales codificados por los genes de un virus de la gripe de la descripción. La proteína viral pueden ser una proteína HA madura. La proteína HA madura puede comprender uno o más de los siguientes: una serina en la posición 82; una leucina en la posición 221; una treonina en la posición 327; y/o una treonina en la posición 482. La proteína HA madura puede tener una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 34, o un fragmento o variante funcional y/o inmunogénico de SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 34. La proteína viral puede ser una proteína NA, proteína NS, proteína PB, proteína PA o proteína MA. Pueden usarse proteínas y péptidos virales para generar anticuerpos que se unen específicamente a la proteína o péptido. También pueden usarse proteínas y péptidos virales de la presente invención como inmunógenos y en composiciones de vacunas.

40 La presente descripción también se refiere a composiciones y métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe que es capaz de infectar a un animal hospedador susceptible y provocar enfermedad respiratoria. La descripción puede usarse para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe de cualquier subtipo en un animal hospedador susceptible. Por ejemplo, el virus de la gripe puede ser un subtipo de HA de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16, y un subtipo de NA de N 1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. En una realización, el subtipo de HA es H3 o H5. El subtipo de NA puede ser N7 o N8. Puede inducirse una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe del subtipo H3N8. El animal hospedador puede ser un cánido. Los cánidos incluyen cánidos silvestres, de zoológico y domésticos, tales como lobos, coyotes y zorros. Los cánidos también incluyen perros, particularmente perros domésticos, tales como, por ejemplo, perros de compañía de raza pura y/o mestizos, perros de exhibición, perros de trabajo, perros pastores, perros de caza, perros guardianes, perros policía, perros de carreras y/o perros de laboratorio. El animal hospedador puede ser un perro domesticado, tal como un galgo. Puede administrarse a un animal una cantidad eficaz de una composición inmunogénica suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe de la invención. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria protectora que es capaz de prevenir o minimizar la infección viral en el animal hospedador inmunizado durante algún periodo de tiempo posterior a la inmunización. Por lo tanto, la descripción también se refiere a composiciones de vacuna y métodos que pueden proporcionar a un animal vacunado una respuesta inmunitaria protectora a un virus.

60 Como se describe en este documento, las composiciones de vacuna o inmunogénicas pueden comprender virus completos sin células, incluyendo virus atenuados o inactivados, o partes de virus, incluyendo partículas de subvirión (incluyendo "vacuna dividida" en la que se trata un virión para retirar algunos o todos los lípidos virales), proteínas virales (incluyendo proteínas individuales y complejos macromoleculares de múltiples proteínas), polipéptidos y péptidos, así como líneas celulares infectadas por virus, o una combinación de cualquiera de éstos. Las composiciones de vacuna o inmunogénicas que comprenden líneas celulares infectadas por virus pueden comprender múltiples líneas celulares, cada una infectada con una cepa viral diferente.

- Puede inmunizarse un cánido con una o más vacunas de virus de la gripe inactivado (es decir, muerto) y/o vivo atenuado o vacunas que comprenden uno o múltiples antígenos de virus de la gripe de uno o más aislados de virus. El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe canina. El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe equina que codifica o expresa un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencias de aminoácidos con un polipéptido de virus de la gripe canina. Un antígeno de la gripe usado en una vacuna de la presente descripción puede tener al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia con un antígeno de HA y/o antígeno de NA de un virus de la gripe canina.
- 5
- 10 Un ejemplo de una vacuna inactivada es EQUICINE II™, que se ha comercializado por Intervet Inc. (Millsboro, DE, Estados Unidos) como una vacuna líquida. EQUICINE II™ contiene virus de la gripe A/Pensilvania/63 inactivado ("A/Pa/63") y virus de la gripe A/equino/Kentucky/93 ("A/KY/93") con carbopol (es decir, HAVLOGEN® (Intervet Inc.)). Más específicamente, una dosis de EQUICINE II™ contiene: A/Pa/63 inactivado a 10^{6,0} EID₅₀, A/KY/93 inactivado a 10^{6,7} EID₅₀, carbopol 0,25% en volumen y suficiente PBS para crear un volumen total de 1 ml.
- 15
- Otro ejemplo de una vacuna inactivada es virus de la gripe equina A/equino/Ohio/03 ("Ohio 03"). En algunas realizaciones, dicha vacuna contiene CARBIGEN™, que es un adyuvante basado en polímero emulsionado disponible en el mercado de MVP Laboratories, Inc. (Ralston, NE). En tales vacunas, una unidad de dosificación típicamente comprende al menos aproximadamente 250 unidades de HA del virus, de aproximadamente 250 a
- 20 aproximadamente 12.500 unidades de HA del virus, o de aproximadamente 1000 a aproximadamente 6200 unidades de HA del virus. La concentración recomendada de CARBIGEN™ es de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 30% (en masa).
- Un ejemplo de una vacunada atenuada viva es gripe equina/Kentucky/91 ("A/KY/91") viva modificada en forma de
- 25 una vacuna liofilizada que puede reconstituirse con agua. Esta reconstitución puede realizarse usando agua de uso en vacunas suficiente para llevar la dosificación de la vacuna a un volumen total de 1 ml. Se analizan aspectos de tales vacunas en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.436.408; 6.398.774; y 6.177.082, que se incorporan por referencia en su totalidad en esta patente. Cuando se reconstituye, una dosis de dicha vacuna puede,
- 30 por ejemplo, contener AIKY/91 a 10^{7,2} DICT₅₀ por ml, 0,015 gramos de N-Z AMINE AS™ por ml, 0,0025 gramos de gelatina por ml y 0,04 gramos de lactosa D por ml. N-Z AMINE AS™ es una fuente refinada de aminoácidos y péptidos producidos por hidrólisis enzimática de caseína. N-Z AMINE AS™ se comercializa por Kerry Bio-Science (Norwich, NY, Estados Unidos).
- Las vacunas pueden comprender un antígeno de gripe H3 que tiene al menos aproximadamente un 93% de
- 35 homología con Florida/43/2004 en secuencias codificantes de HA, tales como, por ejemplo, la cepa de equino/New Market/79. La homología preferida es al menos aproximadamente el 96%, tal como, por ejemplo, las cepas equino/Alaska/1/91 y equino/Santiago/85. En los ejemplos posteriores, se incorporaron en vacunas los antígenos de gripe equino/Kentucky/91, equino-2/Kentucky/93, equino-1/Pensilvania/63, y equino/Ohio/03. Las vacunas preferidas también incluyen vacunas que comprenden equino/Wisconsin/03, equino/Kentucky/02, equino/Kentucky/93 y
- 40 equino/New Market2/93. En los ejemplos proporcionados a continuación, se usaron virus H3N8. Se cree, sin embargo, que pueden usarse otros virus de gripe H3.
- Pueden prepararse vacunas atenuadas vivas por medios convencionales. Tales medios generalmente incluyen, por
- 45 ejemplo, modificar cepas patógenas por pase *in vitro*, adaptación al frío, modificación de la patogenia del organismo por manipulación genética, preparación de quimeras, inserción de antígenos en vectores virales, selección de cepas de tipo de silvestre no virulentas, etc.
- La cepa de virus atenuado vivo puede obtenerse por pase en serie del virus de tipo silvestre a través de cultivo
- 50 celular, animales de laboratorio, animales no hospedadores o huevos. La acumulación de mutaciones genéticas durante tales pases típicamente conduce a una pérdida progresiva de virulencia del organismo para el hospedador original.
- La cepa de virus atenuado vivo puede prepararse por co-infección de células permisibles con un virus mutante
- 55 atenuado y virus patógeno. El virus recombinante resultante deseado tiene la seguridad del virus atenuado con genes que codifican antígenos protectores procedentes del virus patógeno.
- La cepa de virus atenuado vivo puede prepararse por adaptación al frío. Un virus adaptado al frío tiene la ventaja de replicar solamente a la temperatura hallada en el tracto respiratorio superior. En la Patente de Estados Unidos N°
- 60 6.177.082 se ha descrito un método para la generación de un virus de la gripe equina adaptado al frío. Un virus adaptado al frío resultante deseado confiere uno o más de los siguientes fenotipos: adaptación al frío, sensibilidad a temperatura, interferencia dominante y/o atenuación.
- La cepa de virus atenuado vivo puede prepararse por medios moleculares, tales como mutación puntual, delección o
- 65 inserción para convertir un virus patógeno en un virus no patógeno o menos patógeno en comparación con el virus original, conservando a la vez las propiedades protectoras del virus original.

ES 2 393 406 T3

El virus atenuado vivo puede prepararse clonando el candidato de genes de antígenos protectores en un genoma de un virus no patógeno o menos patógeno u otro organismo.

5 Pueden prepararse vacunas de virus inactivados (es decir, "muertos") inactivando el virus usando métodos convencionales. Típicamente, tales vacunas incluyen excipientes que pueden potenciar una respuesta inmunitaria, así como otros excipientes que se usan convencionalmente en vacunas. Por ejemplo, en los ejemplos posteriores, EQUICINE II™ comprende HAVLOGEN®. La inactivación del virus puede conseguirse tratando el virus con compuestos químicos de inactivación (por ejemplo, formalina, beta propiolactona ("BPL"), bromoetilamina ("BEA"), y etilenimina binaria ("BEI")) o por métodos no químicos (por ejemplo, calor, congelación/descongelación o sonicación) para desactivar la capacidad de replicación del virus.

15 En los ejemplos proporcionados a continuación, se usó equino/Ohio/03 como un virus de exposición. Se sabe que tiene aproximadamente el 99% de homología con aislados de Florida/43/04, y se ha mostrado que induce síntomas de infección y seroconversión en perros. El Ejemplo 18 ilustra la eficacia de vacunas de gripe equina en perros, mostrando titulaciones de inhibición de hemaglutinación (o "HI" o "HAI") en perros vacunados con antígeno Ohio 03 inactivado en una composición de vacuna que comprende adyuvante CARBIGEN™. La Tabla 29 muestra titulaciones antes de la vacunación, después de la vacunación y después de la segunda vacunación, así como después de la exposición. Los resultados indican titulaciones de HI en cada etapa después de la vacunación para los perros vacunados, con poco o ningún aumento para los controles. La Tabla 30 ilustra las señales clínicas, aislamiento de virus y resultados de histopatología del mismo estudio. Aunque los animales expuestos no mostraron señales clínicas, difusión viral o histopatología positiva, las titulaciones de HI positivas (Tabla 29) indican titulaciones de anticuerpo significativas en animales inmunizados.

25 Debería tenerse en cuenta que la presente descripción también incluye otras vacunas de antígeno de virus de la gripe H3.

30 Debería observarse adicionalmente que pueden usarse antígenos de la gripe distintos de antígenos de virus de la gripe H3 de acuerdo con la presente descripción. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, los de equino/PA/63, que es un subtipo A1 equino (H7N7). Se contempla que uno o más de tales antígenos pueden usarse con o sin uno o más antígenos de gripe H3.

35 En general, la vacuna se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para inducir una respuesta protectora en el paciente canino contra el virus diana. Típicamente, una dosificación es "terapéuticamente eficaz" si previene, reduce el riesgo de, retarda la aparición de, reduce la proliferación de, alivia, suprime o erradica la gripe o uno o más (típicamente dos o más) de sus síntomas. Los síntomas de la gripe típicos incluyen, por ejemplo, fiebre (para perros, típicamente $\geq 103,0$ °F; $\geq 39,4$ °C), tos, estornudos, lesiones histopatológicas, descarga ocular, descarga nasal, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, náuseas, hemoptisis y/o estertores audibles. Con frecuencia, los síntomas más graves pueden incluir, por ejemplo, hemorragia en los pulmones, mediastino o cavidad pleural; traqueítis; bronquitis; bronquiolitis; bronconeumonía supurativa; y/o infiltración del revestimiento epitelial y lúmenes de las vías respiratorias de los pulmones con neutrófilos y/o macrófagos.

45 La vacuna puede administrarse como parte de una terapia de combinación, es decir, una terapia que incluye, además de la propia vacuna, la administración de uno o más agentes activos, adyuvantes, terapias, etc., adicionales. En ese caso, debería reconocerse que la cantidad de vacuna que constituye una cantidad "terapéuticamente eficaz" puede ser menor que la cantidad de vacuna que constituiría una cantidad "terapéuticamente eficaz" si la vacuna fuera a administrarse sola. Otras terapias pueden incluir las conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, medicaciones antivirales, analgésicos, medicaciones reductoras de fiebre, expectorantes, medicaciones anti-inflamación, antihistamínicos, antibióticos para tratar infecciones bacterianas que resultan de la infección por virus de la gripe, reposo y/o administración de fluidos. Las vacunas pueden administrarse en combinación con una vacuna de *Bordetella*, vacuna de adenovirus y/o vacuna de virus paragrupal.

55 Una dosis típica para una vacuna atenuada viva puede ser al menos aproximadamente 10^3 ufp/cánido; y más típicamente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^9 ufp/cánido. En la presente descripción "ufp" significa "unidades formadores de placas". Una dosis típica para una vacuna atenuada viva puede ser al menos aproximadamente 10^3 DICT₅₀/cánido, y más típicamente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^9 DICT₅₀/cánido. Una dosis típica para una vacuna atenuada viva puede ser al menos aproximadamente 10^3 EID₅₀/cánido, y más típicamente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^9 EID₅₀/canino. Una dosis típica para una vacuna muerta puede ser al menos aproximadamente 40 unidades de HA, típicamente de aproximadamente 40 a aproximadamente 10.000 unidades de HA, y más típicamente de aproximadamente 500 a aproximadamente 6.200 unidades de HA. La dosis puede ser de aproximadamente 6.100 a aproximadamente 6.200 unidades de HA.

65 La vacuna puede comprender una vacuna atenuada viva a una concentración que es al menos aproximadamente $10^{0,5}$ ufp/cánido mayor que el nivel de inmunogenicidad. La vacuna puede comprender una vacuna atenuada viva a una concentración que es al menos aproximadamente $10^{0,5}$ DICT₅₀/cánido mayor que el nivel de inmunogenicidad.

La vacuna puede comprender una vacuna atenuada viva a una concentración que es al menos aproximadamente $10^{0,5}$ EID₅₀/cánido mayor que el nivel de inmunogenicidad.

5 El nivel de inmunogenicidad puede determinarse experimentalmente por técnicas de estudio de titulación de dosis de exposición generalmente conocidas en este campo. Tales técnicas típicamente incluyen vacunar a varios cánidos con la vacuna a diferentes dosificaciones, y después exponer los cánidos al virus virulento para determinar la dosis protectora mínima.

10 Los factores que afectan al régimen de dosificación preferido pueden incluir, por ejemplo, el tipo (por ejemplo, especie y raza), edad, peso, sexo, dieta, actividad, tamaño de los pulmones y estado del sujeto; la vía de administración; la eficacia, seguridad y duración de perfiles de inmunidad de la vacuna particular usada; si se usa un sistema de suministro; y si la vacuna se administra como parte de una combinación de fármacos y/o vacunas. Por lo tanto, la dosificación empleada realmente puede variar para animales específicos y, por lo tanto, puede desviarse de las dosificaciones típicas expuestas anteriormente. La determinación de tales ajustes de dosificación generalmente
15 está dentro de la experiencia de la técnica usando medios convencionales. Debería tenerse en cuenta que los virus vivos atenuados generalmente se autopropagan; por lo tanto, la cantidad específica administrada de dicho virus no es necesariamente crítica.

20 Se contempla que la vacuna puede administrarse al paciente canino una sola vez; o, como alternativa, dos o más veces durante días, semanas, meses o años. La vacuna puede administrarse al menos dos veces. La vacuna puede administrarse dos veces, administrándose la segunda dosis (por ejemplo, el refuerzo) al menos aproximadamente 2 semanas después de la primera. La vacuna puede administrarse dos veces, administrándose la segunda dosis no más de 8 semanas después de la primera. La segunda dosis puede administrarse de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 años después de la primera dosis, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 semanas después de la primera dosis, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 semanas después de la primera dosis.
25 La segunda dosis puede administrarse aproximadamente 4 semanas después de la primera dosis. La primera y posteriores dosificaciones pueden variar, tal como, por ejemplo, en cantidad y/o forma. Con frecuencia, sin embargo, las dosificaciones son iguales en cuanto a cantidad y forma. Cuando se administra solamente una dosis sencilla, la cantidad de vacuna en esa dosis solamente comprende generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna. Cuando, sin embargo, se administra más de una dosis, las cantidades de vacuna en esas dosis juntas pueden constituir una cantidad terapéuticamente eficaz.

30 La vacuna puede administrarse antes de que el receptor canino se infecte con gripe. La vacuna puede, por ejemplo, administrarse para prevenir, reducir el riesgo de, o retardar la aparición de la gripe o uno o más síntomas de la gripe (típicamente dos o más).
35

La vacuna puede administrarse después de que el receptor canino se infecte con gripe. La vacuna puede, por ejemplo, aliviar, suprimir, o erradicar la gripe de uno o más síntomas de la gripe (típicamente dos o más).

40 La composición preferida de la vacuna depende de, por ejemplo, si la vacuna es una vacuna inactivada, vacuna viva atenuada, o ambas. También depende del método de administración de la vacuna. Se contempla que la vacuna comprenderá uno o más transportadores, adyuvantes, otros potenciadores de respuesta inmunitaria y/o vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales (denominados colectivamente "excipientes"). Tales excipientes se seleccionan generalmente para ser compatibles con el principio o los principios activos en la vacuna. El uso de
45 excipientes generalmente se conoce por los expertos en la materia.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se usa como adjetivo para indicar que el sustantivo modificado es apropiado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza al excipiente como compatible con los otros ingredientes de la composición y no desfavorablemente perjudicial para el cánido receptor deseado.
50

Las vacunas se pueden administrar por medios convencionales, incluyendo, por ejemplo, administración mucosa (tales como intranasal, oral, intratraqueal y ocular) y administración parenteral. La administración mucosa es con frecuencia particularmente ventajosa para vacunas atenuadas vivas. La administración parenteral también es con frecuencia particularmente ventajosa para vacunas inactivadas.
55

Las vacunas mucosas pueden ser, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, tales como emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados para tales vacunas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol, lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ésteres de alquilo de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfóricos y sulfúricos, gelatina, goma arábiga, alginato sódico, polivinilpirrolidona, y/o alcohol polivinílico. Los excipientes también pueden comprender diversos agentes humectantes, emulsionantes, de suspensión, saporíferos (por ejemplo, edulcorantes) y/o perfumantes.
60

65

Las vacunas mucosas orales también pueden, por ejemplo, comprimirse o encapsularse para una administración conveniente. Tales cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes, tales como citrato sódico, o carbonato o bicarbonato de magnesio o de calcio. Los comprimidos y píldoras
5 adicionalmente pueden prepararse con recubrimientos entéricos.

Se contempla que las vacunas pueden administrarse mediante el agua para beber y/o alimento del paciente canino. Se contempla adicionalmente que las vacunas pueden administrarse en forma de una golosina o juguete.

10 La "administración parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraesternales, inyecciones transcutáneas, e infusión. Las preparaciones inyectables (por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles) pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando excipientes adecuados, tales como vehículos, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y/o agentes de suspensión. Estos típicamente incluyen, por ejemplo, agua,
15 solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, alcohol bencílico, 1,3-butanodiol, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico, aceites fijos insípidos (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos), ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), dimetil acetamida, tensioactivos (por ejemplo, detergentes iónicos y no iónicos), propilenglicol, y/o polietilenglicoles. Los excipientes también pueden incluir pequeñas cantidades de otras sustancias adyuvantes, tales como agentes
20 tamponantes de pH.

Las vacunas pueden incluir uno o más excipientes que potencian la respuesta inmunitaria de un paciente canino (que puede incluir una respuesta de anticuerpos, respuesta celular, o ambas), aumentando de este modo la eficacia de la vacuna. El uso de tales excipientes (o "adyuvantes") puede ser particularmente beneficioso cuando se usa una
25 vacuna inactivada. El adyuvante o adyuvantes pueden ser una sustancia que tenga un efecto directo (por ejemplo, citocina o Bacilo de Calmette-Guerin ("BCG")) o indirecto (liposomas) en células del sistema inmunitario del paciente canino. Los ejemplos de adyuvantes con frecuencia adecuados incluyen aceites (por ejemplo, aceites minerales), sales metálicas (por ejemplo, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio), componentes bacterianos (por ejemplo, liposacáridos bacterianos, adyuvantes de Freund y/o MDP), componentes vegetales (por ejemplo, Quil A) y/o una o
30 más sustancias que tengan un efecto vehículo (por ejemplo, bentonita, partículas de látex, liposomas, y/o Quil A, ISCOM). Como se ha observado anteriormente, los adyuvantes también incluyen, por ejemplo, CARBIGEN™ y carbopol. Debería reconocerse que la presente descripción abarca tanto vacunas que comprenden un adyuvante o adyuvantes, así como vacunas que no comprenden ningún adyuvante.

35 Se contempla que la vacuna puede liofilizarse (o reducirse de otro modo en volumen líquido) para almacenamiento, y después reconstituirse en un líquido antes o en el momento de la administración. Dicha reconstitución puede conseguirse usando, por ejemplo, agua de uso en vacunas.

La presente descripción comprende además kits que son adecuados para su uso en la realización de los métodos descritos anteriormente. El kit comprende una forma de dosificación que comprende una vacuna descrita anteriormente. El kit también comprende al menos un componente adicional y, típicamente, instrucciones para usar la vacuna con el componente o los componentes adicionales. El componente o los componentes adicionales pueden, por ejemplo, ser uno o más ingredientes adicionales (tales como, por ejemplo, uno o más de los excipientes analizados anteriormente, alimento y/o una golosina) que pueden mezclarse con la vacuna antes o durante la
45 administración. El componente o los componentes adicionales pueden como alternativa (o adicionalmente) comprender uno o más aparatos para administrar la vacuna al paciente canino. Un aparato tal puede ser, por ejemplo, una jeringa, inhalador, nebulizador, pipeta, pinzas o cualquier vehículo de suministro médicamente aceptable. El aparato puede ser adecuado para administración subcutánea de la vacuna. El aparato puede ser
50 adecuado para administración intranasal de la vacuna.

También pueden usarse otros excipientes y modos de administración conocidos en la técnica farmacéutica o biológica.

Las composiciones de vacuna o inmunogénicas de la presente descripción también abarcan construcciones basadas en vectores virales recombinantes que pueden comprender, por ejemplo, genes que codifican proteína HA, proteína NA, nucleoproteína, proteína básica de polimerasa, proteína ácida de polimerasa, y/o proteína de la matriz de un virus de la gripe de la presente descripción. Se contempla cualquier vector viral adecuado que pueda usarse para preparar una construcción de virus/vector recombinante para su uso con la descripción objeto. Por ejemplo, con las composiciones y métodos de la presente descripción pueden usarse vectores virales derivados de adenovirus, avipox, virus del herpes, vaccinia, viruela de los canarios, entomopox, viruela porcina, virus del Nilo Occidental y otros conocidos en la técnica. Pueden construirse vectores polinucleotídicos recombinantes que codifiquen y expresen componentes usando técnicas de ingeniería genética convencionales conocidas en este campo. Además, las diversas composiciones de vacuna descritas en este documento pueden usarse por separado y en combinación entre sí. Por ejemplo, las inmunizaciones primarias de un animal pueden usar construcciones basadas en vector
65 recombinante, que tienen componentes de cepa sencilla o múltiple, seguido de refuerzos secundarios con composiciones de vacuna que comprenden virus inactivado o líneas celulares infectadas por virus inactivado. Para

los expertos en la materia serán evidentes otros protocolos de inmunización con las composiciones de vacuna de la descripción y se contemplan dentro del alcance de la presente descripción.

5 La descripción objeto también se refiere a virus redistribuidos que comprenden al menos un gen o segmento genómico de un virus de la gripe de la presente invención y el resto de genes virales o segmentos genómicos de un virus de la gripe diferente de la descripción o de un virus de la gripe distinto de un virus de la presente descripción. Pueden producirse virus redistribuidos por redistribución genética del ácido nucleico de un virus de la gripe donante de la presente descripción con el ácido nucleico de un virus de la gripe receptor y por la selección posterior del virus redistribuido que comprende el ácido nucleico del virus donante. Se conocen bien en la técnica métodos para producir y aislar virus redistribuidos (Fields *et al.*, 1996). Un virus redistribuido puede comprender genes o segmentos genómicos de un virus de la gripe humano, aviar, porcino o equino. Un virus redistribuido puede incluir cualquier combinación de ácido nucleico de virus de la gripe donante y receptor siempre que el virus redistribuido comprenda al menos un gen o segmento genómico de un virus de la gripe donante de la presente invención. Un virus de la gripe receptor puede ser un virus de la gripe equina.

15 También pueden usarse polipéptidos naturales, recombinantes o sintéticos de proteínas virales, y fragmentos peptídicos de los mismos, como composiciones de vacuna de acuerdo con los métodos objeto. Una composición de vacuna puede comprender un polinucleótido o un polipéptido de un virus de la gripe canina. Una composición de vacuna puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante del mismo. El polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, puede comprender la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, respectivamente, o una secuencia que codifica un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78. Un polinucleótido puede comprender: Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 3; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 5; Nucleótidos 1-657 de SEC ID N°: 7; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 9; Nucleótidos 1-1410 de SEC ID N°: 11; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 13; Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 15; Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 19; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 21; Nucleótidos 1-657 de SEC ID N°: 23; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 25; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 29; Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 31; Nucleótidos 1-2277 de SEC ID N°: 47; Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 49; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 51; Nucleótidos 1-690 de SEC ID N°: 53; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 55; Nucleótidos 1-1410 de SEC ID N°: 57; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 59; Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 61; Nucleótidos 1-2277 de SEC ID N°: 63; Nucleótidos 1-2271 de SEC ID N°: 65; Nucleótidos 1-2148 de SEC ID N°: 67; Nucleótidos 1-690 de SEC ID N°: 69; Nucleótidos 1-1494 de SEC ID N°: 71; Nucleótidos 1-1410 de SEC ID N°: 73; Nucleótidos 1-756 de SEC ID N°: 75; y Nucleótidos 1-1695 de SEC ID N°: 77. Una composición de vacuna puede comprender un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma. Una composición de vacuna puede comprender un polinucleótido o un polipéptido de un virus de la gripe equina, en el que el polinucleótido o polipéptido tiene al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia con un polinucleótido o polipéptido de gripe canina. En una composición de vacuna pueden combinarse polipéptidos virales que pueden derivar de múltiples cepas, y usarse para vacunar a un animal huésped. Por ejemplo, pueden combinarse en la vacuna polipéptidos basados en la proteína HA viral de al menos dos cepas diferentes de virus de la gripe. Los polipéptidos pueden ser homólogos de una cepa o pueden comprender polipéptidos "híbridos" o "quiméricos" cuya secuencia de aminoácidos deriva de unir o ligar polipéptidos de al menos dos cepas distintas. Se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar polipéptidos virales. Por ejemplo, pueden sintetizarse polipéptidos y péptidos virales usando métodos de síntesis de fase sólida (Merrifield, 1963). También pueden producirse polipéptidos y péptidos virales usando técnicas de ADN recombinante en las que una molécula polinucleotídica que codifica una proteína o péptido viral se expresa en una célula huésped, tal como líneas celulares de mamíferos, bacterias o levaduras, y la proteína expresada se purifica usando técnicas convencionales de este campo.

55 Las composiciones de vacuna de la presente descripción también incluyen composiciones de ácido nucleico desnudo. Un ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA y/o una NA de un virus de la gripe. Se conocen en la técnica métodos para la vacunación de ácidos nucleicos y se describen, por ejemplo, en las Patente de Estados Unidos N° 6.063.385 y 6.472.375. El ácido nucleico puede estar en forma de un plásmido o un casete de expresión génica. En una realización, el ácido nucleico se proporciona encapsulado en un liposoma que se administra a un animal.

65 Las composiciones de vacuna e inmunógenos, tales como polipéptidos y ácidos nucleicos, que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción pueden proporcionarse con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos y composiciones útiles en la descripción objeto pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Se describen formulaciones en detalle en varias fuentes que se conocen bien y están fácilmente disponibles para los expertos en la materia. Por ejemplo,

Remington's Pharmaceutical Science por E.W. Martin, Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19^a ed., 1995, describe formulaciones que pueden usarse en relación con la presente invención. En general, las composiciones de la presente descripción se formularán de modo que se combine una cantidad eficaz de un inmunógeno con un vehículo adecuado para facilitar la administración eficaz de la composición. Las composiciones usadas en los presentes métodos también pueden estar en una diversidad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones o suspensiones líquidas, supositorios, soluciones inyectables e infundibles, y pulverizaciones. La forma preferida depende del modo deseado de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones también incluyen preferiblemente vehículos y diluyentes convencionales farmacéuticamente aceptables que se conocen por los expertos en la materia. Los ejemplos de vehículos o diluyentes para su uso con los peptidomiméticos objeto incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, aceites incluyendo aceite mineral, etanol, dimetil sulfóxido, gelatina, ciclodextranos, estearato de magnesio, dextrosa, celulosa, azúcares, carbonato cálcico, glicerol, alúmina, almidón y vehículos y diluyentes equivalentes, o mezclas de cualquiera de éstos. Las formulaciones de un inmunógeno de la descripción también pueden comprender agentes de suspensión, protectores, lubricantes, tampones, conservantes y estabilizadores. Para proporcionar la administración de tales dosificaciones para el tratamiento terapéutico deseado, las composiciones farmacéuticas de la descripción provechosamente comprenderán entre aproximadamente el 0,1% y el 45%, y especialmente, el 1% y el 15% en peso del inmunógeno o inmunógenos basándose en el peso de la composición total incluyendo vehículo o diluyente.

Las composiciones de vacuna e inmunogénicas de la descripción objeto pueden prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la vacuna o inmunógenos se preparan típicamente como inyectables, por ejemplo, soluciones o suspensiones líquidas. La vacuna o inmunógenos se administran de una manera que es compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz e inmunogénica en el receptor. Los patrones de dosificaciones y administración óptimos para una vacuna particular o formulación de inmunógenos pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia.

También pueden proporcionarse péptidos y/o polipéptidos en forma de una construcción de péptido antigénico múltiple (MAP). La preparación de construcciones MAP se ha descrito en Tam (1988). Las construcciones MAP utilizan una matriz central de restos de lisina en la que se sintetizan múltiples copias de un inmunógeno (Posnett *et al.*, 1988). Pueden prepararse múltiples construcciones MAP, conteniendo cada una inmunógenos iguales o diferentes, y administrarse en una composición de vacuna. Una construcción MAP puede proporcionarse con y/o administrarse con uno o más adyuvantes. También pueden producirse polipéptidos de gripe de la invención y administrarse como estructuras proteicas macromoleculares que comprenden uno o más polipéptidos. La Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada US2005/0009008 describe métodos para producir partículas de tipo viral como una vacuna para virus de la gripe.

De acuerdo con los métodos de la presente descripción, las composiciones de vacuna e inmunogénicas descritas en este documento se administran a hospedadores susceptibles, típicamente cánidos, y más típicamente perros domesticados, en una cantidad y manera eficaces para inducir inmunidad protectora contra la posterior exposición del hospedador a o infección por el virus. El animal hospedador puede ser un cánido. Los cánidos incluyen cánidos silvestres, de zoológico y domésticos, tales como lobos, coyotes y zorros. Los cánidos también incluyen perros, particularmente perros domésticos, tales como, por ejemplo, perros de compañía de raza pura y/o mestizos, perros de exhibición, perros de trabajo, perros pastores, perros de caza, perros vigilantes, perros policía, perros de carrera y/o perros de laboratorio. El animal hospedador puede ser un perro domesticado, tal como un galgo. Las vacunas o inmunógenos se administran típicamente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Otros modos adecuados de administración incluyen administración oral o nasal. Habitualmente, las vacunas o inmunógenos se administran a un animal al menos dos veces, con un intervalo de una o más semanas entre cada administración. Sin embargo, se contemplan otros regímenes para las administraciones iniciales y de refuerzo de la vacuna o inmunógenos, y pueden depender del criterio del facultativo y el animal hospedador particular que se trate.

Los virus y células infectadas por virus en una formulación de vacuna pueden inactivarse o atenuarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden inactivarse o atenuarse virus completos y células infectadas mediante exposición a paraformaldehído, formalina, beta propiolactona (BPL), bromoetilamina (BEA), etilenimina binaria (BEI), fenol, luz UV, temperatura elevada, congelación y descongelación, sonicación (incluyendo ultrasonicación), y similares. La cantidad de virus completo sin células en una dosis de vacuna puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg, y más habitualmente pueden ser de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 2 mg. La dosificación para formulaciones de vacuna que comprenden líneas celulares infectadas por virus habitualmente contendrán de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 células por dosis, y más habitualmente de aproximadamente 5×10^6 a aproximadamente $7,5 \times 10^7$ células por dosis. La cantidad de inmunógeno peptídico o proteico en una dosis para un animal puede variar de aproximadamente 0,1 μg a 10000 μg , de aproximadamente 1 μg a 5000 μg , de aproximadamente 10 μg a 1000 μg , de aproximadamente 25 μg a 750 μg , de aproximadamente 50 μg a 500 μg , o de 100 μg a 250 μg , dependiendo del tamaño, edad, etc., del animal que recibe la dosis.

Una composición inmunogénica o de vacuna de la descripción, tal como virus o células infectadas por virus o proteínas o péptidos virales, pueden combinarse con un adyuvante, típicamente justo antes de la administración. Los adyuvantes contemplados para su uso en las formulaciones de vacuna incluyen treonil muramil dipéptido (MDP) (Byars *et al.*, 1987), saponina, *Corynebacterium parvum*, adyuvante completo de Freund e incompleto de Freund, aluminio, o una mezcla de cualquiera de éstos. Se conoce bien en la técnica una diversidad de otros adyuvantes adecuados para su uso con los métodos y vacunas de la presente descripción tales como alumbre, y se contemplan para su uso con la descripción.

La descripción también se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a una proteína o un péptido de la presente invención. Los anticuerpos de la descripción incluyen composiciones de anticuerpos monoclonales y policlonales. Preferiblemente, los anticuerpos de la descripción son anticuerpos monoclonales. En la descripción se contemplan anticuerpos completos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno adecuados incluyen fragmentos de anticuerpo Fab₂, Fab y Fv. Los anticuerpos de la descripción pueden marcarse con un resto detectable, tal como una molécula fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o una enzima).

La presente descripción también se refiere a métodos y composiciones para la detección e identificación de un virus de la gripe de la invención y para el diagnóstico de infección de un animal con un virus de la gripe de la presente invención. Los métodos de la descripción incluyen detección de la presencia de gripe canina, en una muestra biológica de un animal. La detección de gripe canina en una muestra es útil para diagnosticar gripe canina en un animal. A su vez, esta información puede proporcionar la capacidad para determinar el pronóstico de un animal basándose en la distinción de niveles de gripe canina presentes a lo largo del tiempo, y puede ayudar a la selección de agentes terapéuticos y tratamientos para el animal, y ayudar a la supervisión de la terapia. El método también proporciona la capacidad para establecer la ausencia de gripe canina en un animal ensayado.

La capacidad para detectar gripe canina en un animal permite la evaluación de brotes de gripe canina en diferentes localizaciones geográficas. Esta información también permite la detección temprana de modo que los animales infectados puedan aislarse, para limitar la propagación de la enfermedad, y permite la intervención temprana para opciones de tratamiento. Además, tener esta información disponible puede proporcionar dirección al personal médico para prepararse para tratar grandes números de animales enfermos, incluyendo recopilar suministros médicos y, si están disponibles, vacunas.

En una realización, un método de la presente descripción implica la recogida de una muestra biológica de un animal de ensayo, tal como un cánido. La muestra biológica puede ser cualquier material biológico, incluyendo células, tejidos, piel, sangre completa, suero, plasma, aspirado de los pezones, lavado pulmonar, líquido cefalorraquídeo, saliva, sudor y lágrimas.

La muestra de ensayo del animal puede venir de un animal que se sospecha que tiene virus de la gripe canina, tanto si el animal muestra síntomas de la enfermedad como si no. También pueden proporcionarse muestras de control o recogerse de animales que se sabe que no tienen gripe canina. Pueden proporcionarse controles adicionales, por ejemplo, para reducir los resultados de falso positivo y falso negativo, y verificar que los reactivos en el ensayo detectan de forma activa el virus de la gripe canina A.

Además de detectar la presencia o ausencia de gripe canina en una muestra biológica, los métodos de detección usados en la descripción pueden detectar mutaciones en virus de la gripe canina, tales como cambios en la secuencia de ácido nucleico, que pueden resultar del ambiente, tratamiento farmacológico, manipulaciones genéticas o mutaciones, lesión, cambio de la dieta, envejecimiento, o cualquier otra característica o características de un animal. Las mutaciones también pueden provocar que la gripe canina A se vuelva resistente a un fármaco que antes era eficaz, o permitir que el virus infecte y se propague en una especie diferente de animal, o ser humano. Por ejemplo, se ha mostrado que el virus de la gripe aviar A infecta a otros animales y seres humanos.

Para detectar un virus de la gripe en un animal, el diagnóstico se facilita por la recogida de muestras de ensayo de alta calidad, su rápido transporte a una instalación de ensayo, y el almacenamiento apropiado, antes de los ensayos de laboratorio. El virus se detecta mejor en muestras de ensayo que contienen células infectadas y secreciones. Pueden tomarse muestras de ensayo para la detección directa de antígenos virales y/o el aislamiento de ácidos nucleicos y/o virus en cultivos celulares durante los primeros 3 días después de la aparición de síntomas clínicos. Varios tipos de muestras de ensayo son adecuados para diagnosticar infecciones virales del tracto respiratorio superior, incluyendo, pero sin limitación, hisopo nasal, hisopo nasofaríngeo, aspirado nasofaríngeo, lavado nasal e hisopos de garganta. Además de hisopos, pueden tomarse muestras de tejido o suero, y pueden realizarse también procedimientos invasivos.

Pueden recogerse muestras de ensayo respiratorias y transportarse en 1-5 ml de medio de transporte de virus. Están disponibles en el mercado varios medios que son satisfactorios para la recuperación de una amplia diversidad de virus. Las muestras de ensayo clínicas se añaden a un medio de transporte. Los hisopos nasales o nasofaríngeos también pueden transportarse en el medio de transporte de virus. Un ejemplo de un medio de transporte es 10 g de caldo de infusión de ternera y 2 g de fracción de albúmina bovina V, añadido a agua destilada

estéril a 400 m. También se pueden añadir antibióticos tales como 0,8 ml de solución de sulfato de gentamicina (50 mg/ml) y 3,2 ml de anfotericina B (250 µg/ml). El medio preferiblemente se esteriliza por filtración. También pueden usarse lavados nasales, tales como solución salina estéril (NaCl 0,85%) para recoger muestras de ensayo de virus respiratorios.

5 Pueden recogerse sueros en una cantidad de 1-5 ml de sangre completa de un animal en fase aguda, poco después de la aparición de síntomas clínicos, y preferiblemente no más tarde de 7 días. También se puede recoger una muestra de ensayo de suero de fase convaleciente, por ejemplo aproximadamente 14 días después de la aparición de los síntomas. Las muestras de ensayo de suero pueden ser útiles para detectar anticuerpos contra virus respiratorios en un ensayo de neutralización.

10 En algunos casos, pueden recogerse muestras de animales individuales durante un periodo de tiempo (por ejemplo, una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes, dos veces al año o anualmente). Puede usarse la obtención de numerosas muestras de un animal individual, durante un periodo de tiempo, para verificar resultados de detecciones anteriores y/o para identificar respuesta o resistencia a un tratamiento específico, por ejemplo, un fármaco terapéutico seleccionado.

15 Los métodos de la presente descripción pueden usarse para detectar la presencia de uno o más agentes patológicos en una muestra de ensayo de un animal, y el nivel de cada agente patológico. Puede usarse cualquier método para detectar el agente patológico, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de anticuerpos incluyendo ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), hemaglutinación, e inhibición de ensayos de hemaglutinación (HI), y transferencia de Western. También pueden usarse métodos de cultivo celular conocidos. Pueden identificarse adicionalmente cultivos positivos usando inmunofluorescencia de cultivos celulares o ensayo de HI del medio de cultivo celular (sobrenadante).

20 Además, pueden usarse métodos para detectar ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayos de PCR de transcriptasa inversa (RT) y ensayos en tiempo real, y ensayos de protección de nucleasa cuantitativa. Existen kits de ensayo disponibles en el mercado disponibles para realizar estos ensayos. Por ejemplo, QIAGEN (Valencia, CA) vende un kit de RT-PCR de una etapa, y kit de extracción de ARN viral.

25 El método puede utilizar un anticuerpo específico para un virus o proteína viral de la descripción. Puede utilizarse un anticuerpo específico para una proteína HA de un virus de la descripción. Puede usarse un anticuerpo específico para una proteína NP de un virus de la descripción. Se obtiene una muestra adecuada, tal como de la región nasal o nasofaríngea, de un animal y se aísla el virus o la proteína viral de la misma. Los componentes virales se exploran después con respecto a la unión de un anticuerpo específico para una proteína, tal como HA o NP de un virus de la invención. Puede obtenerse una muestra de suero (u otra muestra que contenga anticuerpo) de un animal y explorarse el suero con respecto a la presencia del anticuerpo que se une a una proteína de un virus de la descripción. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo ELISA en el que las paredes de la placa tengan proteína HA y/o NP, o un fragmento peptídico de la misma, unida a la pared. La pared de la placa después se pone en contacto con suero o anticuerpo de un animal de ensayo. La presencia de anticuerpo en el animal que se une específicamente a la proteína HA y/o NP es indicativa de que el animal de ensayo está infectado o se ha infectado con un virus de la gripe de la presente invención.

35 La presencia de un agente patológico puede detectarse determinando la presencia o ausencia de anticuerpos contra el agente, en una muestra biológica. Puede tardarse algún tiempo (por ejemplo meses) después de que un animal se infecte antes de que los anticuerpos puedan detectarse en un ensayo de sangre. Una vez formados, los anticuerpos habitualmente persisten durante muchos años, incluso después del tratamiento satisfactorio de la enfermedad. El hallazgo de anticuerpos para gripe canina A puede no indicar si la infección fue reciente o hace algún tiempo.

40 También pueden realizarse ensayos de anticuerpos en uno o más fluidos. Los ensayos de anticuerpos incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), y transferencia de Western. Preferiblemente, se realizan ensayos de anticuerpos usando múltiples ensayos, por ejemplo ELISA o IFA seguido de transferencia de Western. Los ensayos de anticuerpo pueden realizarse en un proceso de dos etapas, usando un ensayo ELISA o IFA, seguido de un ensayo de transferencia de Western. ELISA se considera un ensayo más fiable y preciso que IFA, pero puede usarse IFA si no está disponible ELISA. El ensayo de transferencia de Western (que es un ensayo más específico) también puede realizarse en todos los animales, particularmente en los que han dado positivo o casi positivo (equivoco) en un ensayo ELISA o IFA.

45 Otros ensayos basados en anticuerpos que pueden usarse para la detección de virus de la gripe incluyen ensayos de inhibición de hemaglutinación. La actividad de hemaglutinación puede detectarse en una muestra biológica de un animal, usando glóbulos rojos de pollo o pavo como se ha descrito (Burlison *et al.*, 1992 y Kendal *et al.*, 1982). Puede ponerse en contacto una proteína o péptido de HA o gripe de la descripción con una muestra de ensayo que contiene suero o anticuerpo. Se añaden después glóbulos rojos (RBC) de un animal, tal como un pájaro. Si está presente anticuerpo para HA, entonces los RBC no se aglutinarán. Si el anticuerpo para HA no está presente, los

RBC se aglutinarán en presencia de HA. Se conocen en la técnica variaciones y modificaciones de los ensayos de inhibición de hemaglutinación convencionales y se contemplan dentro del alcance de la presente descripción.

5 La infección de un animal puede determinarse por aislamiento del virus de una muestra, tal como un hisopo nasal o nasofaríngeo. Puede realizarse aislamiento viral usando métodos convencionales, incluyendo cultivo celular e inoculación de huevos.

10 Puede usarse un ensayo basado en ácido nucleico para la detección de un virus de presente descripción. Puede obtenerse una muestra de ácido nucleico de un animal y someterse el ácido nucleico a PCR usando cebadores que generarán un producto de amplificación si el ácido nucleico contiene una secuencia específica para un virus de la gripe de la presente descripción. Puede usarse RT-PCR en un ensayo para el virus objeto. Puede usarse RT-PCR en tiempo real para ensayar con respecto a un virus de la gripe de la presente descripción. Se conocen en la técnica métodos de PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real y se han descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; 4.965.188; 5.994.056; 6.814.934; y en Saiki *et al.* (1985); Sambrook *et al.* (1989); Lee *et al.* (1993); y Livak *et al.* (1995). El ensayo de PCR puede usar oligonucleótidos específicos para un gen de matriz (MA) y/o gen de HA de la gripe. El producto de amplificación también puede secuenciarse para determinar si el producto tiene una secuencia de un virus de la gripe de la presente descripción. Pueden usarse otros ensayos basados en ácido nucleico para la detección y el diagnóstico de una infección viral por un virus de la descripción y tales ensayos se contemplan dentro del alcance de la presente descripción. Una muestra que contenga un ácido nucleico puede someterse a una amplificación basada en PCR usando cebadores directos e inversos cuando los cebadores son específicos para una secuencia génica o polinucleotídica viral. Si el ácido nucleico en la muestra es ARN, entonces puede realizarse RT-PCR. Para PCR en tiempo real, se utiliza una sonda detectable con los cebadores.

25 Se conocen conjuntos de cebadores específicos para el gen de hemaglutinina (HA) de muchos de los virus de la gripe en circulación, y se están desarrollando continuamente. El genoma del virus de la gripe es ARN monocatenario, y debe realizarse una copia de ADN (ADNc) usando una polimerasa de transcriptasa inversa (RT). La amplificación del genoma de ARN, por ejemplo usando RT-PCR, requiere un par de cebadores oligonucleotídicos, típicamente diseñados basándose en la secuencia de HA conocida de subtipos de gripe A y de neuraminidasa (NM)-1. Los cebadores pueden seleccionarse de modo que amplifiquen específicamente ARN de solamente un subtipo de virus. Pueden analizarse adicionalmente ADN generados por cebadores específicos de subtipo mediante técnicas de genética molecular tales como secuenciación. El ensayo se realiza preferiblemente con un control positivo, o se confirman los productos por secuenciación y comparación con secuencias conocidas. La ausencia de los productos de PCR diana (es decir, un resultado "negativo") puede no descartar la presencia del virus. Los resultados de hisopos clínicos o cultivos celulares infectados pueden después ponerse a disposición a las pocas horas. Se describen ensayos de PCR y RT-PCR para virus de la gripe en Fouchier *et al.*, 2000 y Maertzdorf *et al.*, 2004.

40 La presente descripción también se refiere a métodos para explorar con respecto a compuestos o fármacos que tengan actividad antiviral contra un virus de la presente descripción. Pueden ponerse en contacto células infectadas con un virus de la descripción con un compuesto o fármaco de ensayo. Después se determina la cantidad de virus o actividad viral tras el contacto. Los compuestos o fármacos que muestran actividad antiviral pueden seleccionarse para evaluación adicional.

45 La presente descripción también se refiere a células aisladas infectadas por un virus de la gripe de la presente descripción. La célula puede ser una célula canina, tal como células epiteliales de riñón caninas.

50 La presente descripción también se refiere a células transformadas con un polinucleótido de la presente descripción que codifica un polipéptido de la descripción. Preferiblemente, la secuencia polinucleotídica se proporciona en una construcción de expresión de la descripción. Más preferiblemente, la construcción de expresión posibilita la sobreexpresión en la célula de un polinucleótido unido operativamente de la descripción. La célula puede transformarse con una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, o un fragmento funcional o variante de la misma. La célula puede transformarse con un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 55 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, respectivamente, o una secuencia que codifica un fragmento o variante funcional de cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a células transformadas con una secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 60 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77 o un fragmento o variante, incluyendo una variante degenerada, de cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77.

65

La célula transformada puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una célula vegetal, incluyendo protoplastos, o la célula transformada puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula bacteriana, tal como *E. coli* o *B. subtilis*. Las células animales incluyen células humanas, células de mamífero, células parcialmente caninas, células aviares y células de insectos. Las células vegetales, incluyen, pero sin limitación, células de dicotiledóneas, monocotiledóneas y coníferas.

La presente descripción también se refiere a plantas, incluyendo plantas transgénicas que expresan y producen una proteína o polipéptido viral de la presente invención. Se contemplan por la presente descripción plantas, tejidos vegetales, y células vegetales transformadas con o cultivadas para contener un polinucleótido de la descripción. Preferiblemente, un polinucleótido de la descripción se sobreexpresa en la planta, tejido vegetal o célula vegetal. Las plantas pueden usarse para producir composiciones de vacuna de la gripe de la presente descripción y las vacunas pueden administrarse a través del consumo de la planta (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.484.719 y 6.136.320).

La presente descripción también se refiere a kits para detectar un virus o diagnosticar una infección por un virus de la presente descripción. Un kit puede comprender un anticuerpo de la descripción que se une específicamente a un virus de la gripe de la presente descripción, o una parte antigénica del mismo. Un kit puede comprender uno o más polipéptidos o péptidos de la presente descripción. Los polipéptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 o 78, o un fragmento funcional y/o inmunogénico o variante de la misma. Un kit puede comprender uno o más polinucleótidos u oligonucleótidos de la presente descripción. Los polinucleótidos pueden tener una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77 o un fragmento o variante de la misma. Un kit puede comprender opcionalmente uno o más anticuerpos de control, polipéptidos o péptidos de control y/o polinucleótidos u oligonucleótidos de control. El anticuerpo, polipéptidos, péptidos, polinucleótidos y/u oligonucleótidos del kit pueden proporcionarse en un recipiente o envase adecuado.

La presente solicitud de descripción también se refiere al uso de perros mestizos como un modelo para infección y patogénesis del virus de la gripe. Puede inocularse a un perro mestizo un virus de la gripe, tal como un virus de la gripe canina de la presente descripción. Opcionalmente, pueden administrarse al perro agentes terapéuticos después de la inoculación. También puede administrarse al perro una composición para generar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe antes de la inoculación con el virus. Pueden obtenerse muestras de tejido, sangre, suero y otras muestras biológicas antes y/o después de la inoculación y examinarse con respecto a la presencia de virus y patogénesis de tejido usando métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, PCR, RT-PCR, secuenciación de ácidos nucleicos e inmunohistoquímica.

Se depositaron cepas del virus de la gripe canina (designadas como "A/canino/Florida/43/2004" y "A/canino/Florida/242/2003") en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 9 de octubre de 2006. Se depositaron cepas del virus de la gripe canina (designadas "canino/Jax/05" y "canino/Miami/05"), en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 17 de octubre de 2006. Las cepas del virus se han depositado en condiciones que aseguran que estará disponible el acceso a los cultivos durante el trámite de la presente patente a alguien que se ha determinado por el Comisario de Patentes y Marcas que tiene derecho a ello según 37 CFR 1.14 y 35 U.S.C. 122. El depósito estará disponible según se requiera por las leyes de patente extranjeras en países en los que se presenten homólogos de la patente objeto, o su descendencia. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para poner en práctica la invención objeto en menoscabo de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

Además, los depósitos de virus se almacenarán y se pondrán a disposición del público de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, es decir, se almacenarán con todo el cuidado necesario para mantenerlos viables y no contaminados durante un periodo de al menos cinco años después de la petición más reciente para proporcionar una muestra del depósito y, en cualquier caso, durante un periodo de al menos treinta (30) años después de la fecha de depósito o durante la vida ejecutable de cualquier patente que pueda expedirse que describa el cultivo. El depositante reconoce la obligación de reemplazar el depósito si el depositario fuera incapaz de proporcionar una muestra cuando se solicite, debido a la condición del depósito. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público del depósito del cultivo objeto se retirarán irrevocablemente tras la concesión de una patente que lo describa.

La tabla 57 ilustra las similitudes entre las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de hemaglutinina (o "HA"), neuraminidasa (o "NA"), y nucleoproteína (NP), del virus de la gripe canina identificado como A/canino/Florida/43/2004 (Cal/Fla/43/04) con aislados equinos de H3N8, así como el aislado de canino/Florida/242/2003.

En la medida en que los siguientes ejemplos se refieren a la materia objeto de las reivindicaciones, estos son ilustrativos de la presente invención. Por lo demás, los ejemplos se proporcionan para fines de información solamente.

Materiales y métodos para los Ejemplos 1-6Recogida de sangre e hisopo nasal de galgos

5 Se recogieron muestras sanguíneas agudas y convalecientes por venopunción yugular de galgos normales o clínicamente enfermos en perreras de carrera que experimentaron brotes de enfermedad respiratoria. Las muestras convalecientes se recogieron de 4 a 12 semanas después de la muestra aguda. El suero se recogió y almacenó a -80 °C. Se recogieron hisopos nasales y se situaron en medio de transporte Amies con carbón vegetal (Becton Dickinson Biosciences) en espera de su presentación para aislamiento bacteriano.

10

Examen post mórtem de galgos

Se realizaron exámenes post mórtem completos por el Servicio de Patología Anatómica en el Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida (UF CVM) en 5 de los 8 galgos que murieron en el brote de enero de 2004 en una pista de Florida. Se realizó un examen post mórtem de otro perro en una clínica veterinaria privada con presentación de tejidos al UF CVM para diagnóstico histopatológico. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra 10%, incluida en parafina, y se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina y eosina para diagnóstico histopatológico o se procesaron para inmunohistoquímica como se describe posteriormente. Se presentaron tejidos no fijados para cultivo bacteriano y también se almacenaron a -80 °C.

20

Ensayos serológicos para patógenos respiratorios virales caninos

Se presentaron muestras de suero agudas y convalecientes emparejadas al Laboratorio de Diagnóstico de Salud Animal (AHDL) en el Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cornell para ensayos de neutralización de suero frente a virus del moquillo canino, adenovirus de tipo 2 y virus paragripal. Las titulaciones de anticuerpo se expresaron como la última dilución de suero que inhibía la infección viral de cultivos celulares. La seroconversión, definida como un aumento ≥ 4 veces en la titulación de anticuerpos entre la muestra aguda y convaleciente, indicó infección viral. No se detectaron seroconversiones para estos patógenos virales.

25

Ensayos microbianos para patógenos respiratorios bacterianos caninos

Se presentaron tejidos post mórtem e hisopos nasales emparejados al Servicio de Microbiología/Parasitología/Serología Clínica de Diagnóstico en el UF CVM para aislamiento e identificación bacteriana. Las muestras se cultivaron en medio no selectivo así como medio selectivo para especies de *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel) y especies de *Mycoplasma* (Remel). Todos los cultivos se mantuvieron durante 21 días antes de que se informara de falta de crecimiento. También se presentaron hisopos nasales de algunos de los galgos al Departamento de Medicina Diagnóstica/Patobiología en el Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Kansas para cultivo bacteriano. De 70 perros clínicamente enfermos ensayados, se aisló *Bordetella bronchiseptica* de la cavidad nasal de un perro, mientras que se recuperó *Mycoplasma spp.* de la cavidad nasal de 33 perros. Se recuperó habitualmente *Pasteurella multocida* de la cavidad nasal de perros con descargas nasales purulentas. Dos de los perros que murieron en el brote de enero de 2004 tenían escaso crecimiento de *Escherichia coli* en los pulmones post mórtem, un perro tenía escaso crecimiento de *E. coli* y *Streptococcus canis*, y otro tenía escaso crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y una levadura. No se aisló ni *Bordetella bronchiseptica* ni *Mycoplasma* de la tráquea o pulmones de perros que murieron.

40

45

Aislamiento de tejidos post mórtem

Se descongelaron tejidos congelados y se homogeneizaron en 10 volúmenes de medio esencial mínimo (MEM) complementado con albúmina de suero bovino 0,5% (BSA) y antibióticos. Se retiraron los residuos sólidos por centrifugación y se inocularon los sobrenadantes en células cultivadas o en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Los homogeneizados tisulares de galgos que murieron se inocularon en diversos cultivos celulares que soportaban la replicación de una amplia serie de patógenos virales. Los cultivos celulares incluyeron Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano, ATCC N° CCL-81), A-72 (fibroblastos de tumor canino, CRL-1542), HRT-18 (células epiteliales rectales humanas, CRL-11663), MDCK (células epiteliales de riñón canino, CCL-34), células epiteliales de riñón canino primarias (AHDL, Universidad de Cornell), células epiteliales de pulmón canino primarias (AHDL), y células testiculares bovinas primarias (AHDL). Las células MDCK y HRT se cultivaron en MEM complementado con tripsina tratada con TPCK 2,5 µg/ml (Sigma); las líneas celulares restantes se cultivaron en MEM complementado con suero de ternero fetal 10% y antibióticos. Las células se cultivaron en matraces de 25 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ 5%. Se inoculó un cultivo de control con el MEM complementado. Los cultivos se observaron diariamente con respecto a cambios morfológicos y se recogieron 5 días después de la inoculación. Los fluidos y células recogidos se clarificaron por centrifugación y se inocularon en células nuevas como se ha descrito para la inoculación inicial; se realizaron dos pases ciegos. Se determinó la actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados usando glóbulos rojos de pollo o pavo como se ha descrito (Burleson *et al.*, 1992; Kendal *et al.*, 1982). Para el aislamiento de virus en embriones de pollo, se inocularon 0,1 ml de homogeneizado tisular en el saco alantoideo y se incubó durante 48 horas a 35 °C. Después de dos pases ciegos, se determinó la actividad de hemaglutinación en los fluidos alantoideos como se ha descrito

50

55

60

65

(Burleson *et al.*, 1992; Kendal *et al.*, 1982).

RT-PCR, secuenciación de nucleótidos y análisis filogenéticos

- 5 Se extrajo ARN total del sobrenadante de cultivo tisular o fluido alantoideo usando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total (10 ng) se transcribió de forma inversa a ADNc usando un Kit de RT-PCR de una etapa (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó amplificación por PCR de la región codificante de los 8 genes virales de la gripe en el ADNc como se ha descrito previamente (Klimov *et al.*, 1992a) usando conjuntos de cebadores específicos de genes universales. Los
10 amplicones de ADN resultantes se usaron como moldes para secuenciación automática en un secuenciador de ADN automático Applied Biosystems 3100 usando química de terminador de colorante de secuenciación cíclica (ABI). Se analizaron las secuencias de nucleótidos usando el GCG Package[®], Versión 10.0 (Accelrys) (Womble, 2000). Se usó el Phylogeny Inference Package[®], Versión 3.5 para estimar las filogenias y calcular los valores bootstrap de las secuencias de nucleótidos (Felsenstein, 1989). Se compararon los árboles filogenéticos con los generados por
15 análisis de unión de vecinos con el modelo Tamura-Nei gamma implementado en el programa MEGA[®] (Kumar *et al.*, 2004) y se confirmaron por el programa PAUP[®] 4.0 Beta (Sinauer Associates).

Inoculación experimental de perros

- 20 Se usaron cuatro beagles sin patógenos específicos de 6 meses de edad [(2 machos y 2 hembras (Liberty Research)]. El examen físico y los ensayos de sangre de línea basal incluyendo diferencial/recuento de células sanguíneas completas, panel de química de suero, y análisis de orina determinaron que los animales estaban sanos. Se alojaron juntos en una instalación mejorada por BSL 2 acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Las temperaturas rectales de línea basal se registraron dos
25 veces diariamente durante 7 días. Los perros se anestesiaron por inyección intravenosa de propofol (Diprivan[®], Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg de peso corporal hasta efecto para intubación con tubos endotraqueales. Se inoculó a cada perro una dosis total de 10^{6.6} dosis infecciosas de cultivo tisular medianas (DICT₅₀) de virus A/Canino/Florida/43/2004 (Canino/FU04) (H3N8) con la mitad de la dosis administrada a la tráquea distal a través del tubo endotraqueal y la otra mitad administrada en la fosa nasal profunda a través de un catéter. Se realizaron
30 exámenes físicos y registros de temperatura rectal dos veces al día durante 14 días después de la inoculación (p.i.). Se recogieron muestras sanguíneas (4 ml) por venopunción yugular los días 0, 3, 5, 7, 10 y 14 p.i. Se recogieron muestras de ensayo nasales y orofaríngeas con hisopos de poliéster (Fisher Scientific) de cada perro los días 0 a 5, 7, 10 y 14 p.i. Los hisopos se colocaron en medio de transporte viral (Remel) y se almacenaron a -80 °C. Se sacrificaron dos perros (1 macho y 1 hembra) por inoculación intravenosa de solución Beuthanasia-D[®] (1 ml/5 kg de peso corporal; Schering-Plough Animal Health Corp) el día 5 p.i. y los 2 perros restantes el día 14 para examen post
35 mórtem. Los tejidos para análisis histológico se procesaron como se ha descrito. Los tejidos para cultivo de virus se almacenaron a -80 °C. Este estudio se aprobó por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucionales de la Universidad de Florida.

40 Difusión viral en perros inoculados de forma experimental

- Se prepararon diluciones en serie de homogeneizados de pulmón y extractos de hisopo, preparados por clarificación del medio de transporte del hisopo por centrifugación, en MEM complementado con BSA al 0,5% y antibióticos. Se realizaron ensayos de placa como se ha descrito (Burleson *et al.*, 1992) usando monocapas de células MDCK en
45 placas de cultivo tisular de 6 pocillos. Las monocapas celulares inoculadas se recubrieron con MEM complementado que contenía agarosa 0,8% y 1,5 µg/ml de TPCK-tripsina. Las células se cultivaron durante 72 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ 5% antes de la fijación y tinción con violeta de cristal. La concentración de virus se expresó como unidades formadoras de placas (UFP) por gramo de tejido o por hisopo.

50 Inmunohistoquímica

- Se montaron secciones tisulares de pulmón de 5 µm desparafinadas y rehidratadas de los galgos y beagles en portaobjetos Bond-Rite[™] (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) y se trataron posteriormente con proteinasa K (DakoCytomation, Carpintería, CA) seguido de reactivo de bloqueo de peroxidasa (Kit de Peroxidasa Dako[®] EnVision[™], Dako Corp.). Las secciones se incubaron con diluciones 1:500 de anticuerpos monoclonales para virus del moquillo canino (VMRD, Inc.), adenovirus canino de tipo 2 (VMRD, Inc.), virus paragripal canino (VMRD, Inc.) o gripe A H3 (Chemicon International, Inc.) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los controles incluyeron incubación de las mismas secciones con IgG de ratón (1 mg/ml, Serotec, Inc.), e incubación de los anticuerpos monoclonales con secciones de pulmón canino normales. Después del tratamiento con los anticuerpos primarios, las
60 secciones se incubaron con reactivos de sustrato de peroxidasa e inmunoperoxidasa secundarios (Kit de Peroxidasa Dako[®] EnVision[™], Dako Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se trataron con Clarificador n° 2 y Reactivo de Bluing (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), se deshidrataron y se aplicaron cubreobjetos con Permount (ProSciTech).

65

Ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI)

Se incubaron muestras de suero con enzima destructora de receptor (RDE, Denka) (1 parte de suero: 3 partes de RDE) durante 16 horas a 37 °C antes de la inactivación por calor durante 60 minutos a 56 °C. El virus de la gripe A/Canino/FL/04 (H3N8) se cultivó en células MDCK durante 36-48 h a 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo de virus se recogieron, se clarificaron por centrifugación y se almacenaron a -80 °C. El ensayo de HI se realizó como se ha descrito previamente (Kendal *et al.*, 1982). En resumen, se añadieron 4 unidades de hemaglutinación de virus en 25 µl a un volumen igual de suero diluido en serie en pocillos de microtitulación y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió un volumen igual de eritrocitos de pavo 0,5% v/v y las titulaciones de hemaglutinación se estimaron visualmente después de 30 minutos. El criterio de valoración de titulación de HI se definió como la última dilución de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. La seroconversión se definió como aumento de ≥ 4 veces en titulación de HI entre muestras, convalecientes y agudas emparejadas. La seropositividad de una muestra sencilla se definió como una titulación de anticuerpo de HI $\geq 1:32$.

15 Ensayo de microneutralización (MN)

Se detectaron respuestas de anticuerpo de suero neutralizador a A/Canino/FL/04 (H3N8) por un ensayo de MN como se ha descrito previamente (Rowe *et al.*, 1999) excepto porque los sueros caninos se trataron con RDE como se ha descrito anteriormente antes del ensayo. El criterio de valoración de titulación se definió como la mayor dilución de suero que proporcionaba 50% de neutralización de 100 DICT₅₀ de virus. La seroconversión se definió como aumento de ≥ 4 veces en titulación de MN entre muestras emparejadas agudas y convalecientes. La seropositividad de una muestra sencilla se definió como una titulación de MN $\geq 1:80$.

A continuación se proporcionan ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención y la descripción adjunta. Estos ejemplos no deberían interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de disolvente son en volumen a no ser que se indique otra cosa.

EJEMPLO 1

En enero de 2004, se produjo un brote de enfermedad respiratoria en 22 galgos de carrera alojados en 2 perreras en una pista de Florida y la granja local que proporcionaba perros a estas perreras. Había aproximadamente 60 perros en cada edificio de perrera y 300 perros en la granja. El brote se produjo durante un periodo de 6 días después del cual no se identificaron nuevos casos. Catorce de los 22 perros tuvieron fiebres de 39,5 a 41,5 °C, una tos blanda, con náuseas durante 10 a 14 días, y con el tiempo recuperación. De los 8 perros restantes, 6 perros aparentemente sanos murieron inesperadamente de hemorragia de la boca y nariz. Otros dos perros se sacrificaron en un periodo de 24 horas desde la aparición de la hemorragia de la boca y nariz debido a un rápido deterioro. Estos dos perros tenían fiebres de 41 °C. Cuatro de las 8 muertes se produjeron en los edificios de perrera y 4 se produjeron en la granja. El cincuenta por ciento de las muertes se produjo el día 3 del brote. Los 22 perros variaban en edad de 17 meses a 4 años, pero el 73% eran de 17 a 33 meses de edad.

Fueron evidentes dos síndromes clínicos: una enfermedad más leve caracterizada por fiebre inicial y después tos durante 10-14 días (14 perros) con recuperación posterior, o una muerte peraguda asociada con hemorragia en el tracto respiratorio (8 perros para una tasa de mortalidad del 36%). Se realizaron exámenes post mórtem en 6 de los 8 casos letales. Todos los perros tenían hemorragia extensiva en los pulmones, mediastino y cavidad pleural. El examen histológico del tracto respiratorio reveló que además de la hemorragia pulmonar, todos los perros tenían traqueítis, bronquitis, bronquiolitis y bronconeumonía supurante (Figura 3). El revestimiento epitelial y el lumen de las vías respiratorias en estos tejidos se infiltraron por neutrófilos y macrófagos. Se inocularon homogeneizados de pulmón preparados a partir de estos perros en una diversidad de líneas celulares de mono, humanas, bovinas y caninas para cultivo de virus. El homogeneizado pulmonar de un perro provocó efectos citopáticos en células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas en presencia de tripsina, y el sobrenadante de cultivo celular aglutinó glóbulos rojos de pollo. Se proporcionaron pruebas preliminares de un virus de la gripe de tipo A por un ELISA comercial para detección de la nucleoproteína de virus de la gripe A y B, y por análisis de PCR usando cebadores específicos para el gen de la matriz del virus de la gripe A. Además, la actividad de hemaglutinación se inhibió por antisuero de referencia contra la gripe equina A subtipo H3, pero no por antisueros específicos para gripe humana A subtipos H1-H11 y H13 (Tabla 3). Para caracterizar las propiedades moleculares del virus, los inventores determinaron las secuencias de nucleótidos de los 8 segmentos de ARN del genoma viral. Las comparaciones de secuencias con genes de virus de la gripe conocidos y los análisis filogenéticos indicaron que los 8 genes del aislado canino eran más similares a los de virus de la gripe equina contemporánea A (H3N8), con los que compartían $\geq 96-97\%$ de identidad de secuencia (Figura 1A, Tabla 4). Por el contrario, los genes representativos de aislados de gripe aviar, porcina y humana A tuvieron $\geq 94\%$ de identidad con el aislado canino (Tabla 4). Estos datos identificaron el aislado canino A/Canino/Florida/43/2004 (Canino/FL/04) como un virus de gripe A H3N8 cercanamente relacionado a linajes contemporáneos de virus de la gripe equina. Puesto que todos los genes del aislado canino eran de origen de virus de gripe equina, los inventores concluyeron que se había transmitido al perro el genoma completo de un virus de gripe equina.

65

EJEMPLO 2

Para investigar el papel del virus Canino/FL/04 en las observaciones clínicas y patológicas en los galgos, los inventores realizaron tinción inmunohistoquímica (IHC) en tejidos pulmonares usando un anticuerpo monoclonal para gripe A H3. El antígeno viral H3 se detectó sistemáticamente en el citoplasma de células epiteliales bronquiales y bronquiolares, células epiteliales de glándulas bronquiales y macrófagos en lúmenes de las vías respiratorias y espacios alveolares (Figura 2A). Estos datos confirman un diagnóstico de infección pulmonar con virus de la gripe del subtipo H3 en múltiples perros.

EJEMPLO 3

Para determinar la implicación de un virus de tipo Canino/FL/04 en la etiología del brote de enfermedad respiratoria, los inventores analizaron sueros emparejados agudos y convalecientes de 11 perros enfermos y 16 contactos asintomáticos por inhibición de hemaglutinación (HI) y microneutralización (MN). La seroconversión, definida como un aumento de ≥ 4 veces en titulación de anticuerpos para Canino/FL/04 de la fase aguda a la convaleciente, se produjo en 8 de 11 (73%) perros enfermos en ambos ensayos (Tabla 1). La seroconversión se produjo en 6 de 16 (38%) contactos asintomáticos en el ensayo de HI, mientras que 8 de 16 (50%) se seroconvirtieron en el ensayo de MN (Tabla 1). Los datos de seroconversión demostraron infección de los perros con un virus de tipo Canino/FL/04 que coincidió temporalmente con la aparición de enfermedad respiratoria en la mayoría de los animales.

Se recogieron muestras de suero sencillas 3 meses después del brote de 46 perros asintomáticos adicionales alojados con los perros enfermos. De estos, 43 (93%) fueron seropositivos en ambos ensayos. Para la población total de 73 perros ensayados, 93% fueron seropositivos en ambos ensayos, incluyendo 82% (9/11) de los perros enfermos y 95% (59/62) de los contactos sanos. La seroprevalencia alta en perros sin historial de enfermedad respiratoria indica que la mayoría de las infecciones con virus de la gripe canina son subclínicas y sugiere propagación eficaz del virus entre perros. No se sabe si las infecciones subclínicas contribuyen a la propagación del virus.

EJEMPLO 4

Para entender mejor la capacidad de virus Canino/FL/04 para infectar perros, se inoculó a cuatro beagles de 6 meses de edad criados para este fin con $10^{6.6}$ dosis infecciosas de cultivo tisular medianas (DICT₅₀) cada uno por las vías intratraqueal e intranasal. Todos los perros desarrollaron una fiebre (temperatura rectal ≥ 39 °C) durante los primeros 2 días después de la inoculación (p.i.), pero ninguno mostró síntomas respiratorios tales como tos o descarga nasal durante un periodo de observación de 14 días. Se examinó la difusión viral mediante cuantificación de virus en hisopos nasales y orofaríngeos. Solamente en 2 de los 4 perros se difundieron cantidades detectables de virus. En un perro se difundió virus los días 1 y 2 p.i. (1.0 - $2.5 \log_{10}$ UFP por hisopo), mientras que en el otro perro se difundió el virus durante 4 días consecutivos después de la inoculación (1.4 - $4.5 \log_{10}$ UFP por hisopo). La examen post mórtem de 2 perros el día 5 p.i. reveló necrotización y traqueítis, bronquitis y bronquiolitis hiperplásica similar a la hallada en la enfermedad espontánea en galgos, pero no hubo hemorragia pulmonar ni bronconeumonía. Se detectó antígeno viral H3 en el citoplasma de células epiteliales de bronquios, bronquiolos y glándulas bronquiales por IHC (Figura 2B). Se recuperó virus infeccioso del tejido pulmonar de uno de los perros. La examen post mórtem de los 2 perros restantes el día 14 p.i. mostró cambios histológicos mínimos en tejidos respiratorios, ausencia de antígeno viral H3 por IHC, y ausencia de recuperación de virus de homogeneizados pulmonares. Se detectó seroconversión en estos últimos dos perros en ensayos de MN el día 7 p.i. con un aumento adicional de 2 a 3 veces en titulaciones de anticuerpos el día 14. Estos resultados establecieron la susceptibilidad de perros a la infección con Canino/FL/04, como se demuestra por la respuesta febril, presencia de antígeno viral y virus infeccioso en el parénquima pulmonar, hallazgos histopatológicos típicos para gripe, y seroconversión. La incapacidad de reproducir enfermedad grave y muerte en los beagles inoculados de forma experimental no es sorprendente puesto que una gran proporción de los galgos infectados de forma natural eran asintomáticos.

EJEMPLO 5

Para investigar si un virus de la gripe de tipo Canino/FL/04 había circulado entre poblaciones de galgos en Florida antes del brote de enero de 2004, se ensayaron sueros de archivo de 65 galgos de carrera con respecto a la presencia de anticuerpos para Canino/FL/04 usando los ensayos de HI y MN. No hubo anticuerpos detectables en 33 perros de los que se tomaron muestras de 1996 a 1999. De 32 perros de los que se tomaron muestras entre 2000 y 2003, 9 eran seropositivos en ambos ensayos – 1 en 2000, 2 en 2002 y 6 en 2003 (Tabla 5). Los perros seropositivos se localizaron en pistas de Florida implicadas en brotes de enfermedad respiratoria de etiología desconocida de 1999 a 2003, lo que sugiere que un virus de tipo Canino/FL/04 podría haber sido el agente causante de esos brotes. Para investigar esta posibilidad adicionalmente, los inventores examinaron tejidos de archivo de galgos que murieron de bronconeumonía hemorrágica en marzo de 2003. Los homogeneizados de pulmón inoculados en células MDCK y embriones de pollo de un perro produjeron virus de la gripe H3N8, denominado A/Canino/Florida/252/2003 (Canino/FL/03). El análisis de la secuencia del genoma completo de Canino/FL/03 reveló >99% de identidad con Canino/FL/04 (Tabla 4), lo indica que los virus de tipo Canino/FL/04 habían infectado galgos antes de 2004.

EJEMPLO 6

De junio a agosto de 2004, se produjeron brotes de enfermedad respiratoria en miles de galgos de carrera en 14 pistas en Florida, Texas, Alabama, Arkansas, Virginia Occidental y Kansas.

Los oficiales en algunas de estas pistas estimaron que al menos 80% de su población canina tuvo enfermedad clínica. La mayoría de los perros tuvieron señales clínicas de fiebre (≥ 39 °C) y tos similar a los perros del brote de enero 2004, pero muchos perros también tuvieron una descarga nasal mucopurulenta. Se informó de múltiples muertes pero no pudo determinarse una tasa de mortalidad precisa.

Los inventores recogieron suero emparejado agudo y convaleciente de 94 perros localizados en 4 pistas de Florida: 56% de estos perros tuvieron aumentos de ≥ 4 veces en titulaciones de anticuerpos para Canino/FL/04 y 100% fueron seropositivos (Tabla 6). Los sueros convalecientes de 29 perros en Virginia Occidental y Kansas también tuvieron anticuerpos para Canino/FL/04. Los inventores aislaron virus de la gripe A (H3N8) de los pulmones de un galgo que murió de una bronconeumonía hemorrágica en una pista en Texas. El análisis de secuencia del genoma completo de este aislado, llamado A/Canino/Texas/1/2004 (Canino/TX/04), reveló $\geq 99\%$ de identidad con Canino/FL/04 (Tabla 4). El aislamiento de tres virus de la gripe cercanamente relacionados de casos caninos letales durante un periodo de 13 meses y de diferentes localizaciones geográficas, junto con las pruebas serológicas sustanciales de infección generalizada entre galgos de carrera, sugirió la circulación prolongada de un virus de tipo Canino/FL/04 en la población de perros.

El análisis filogenético de los genes de HA de Canino/FL/03, Canino/FL/04 y Canino/TX/04 mostró que constituyen un grupo monofilético con soporte de bootstrap robusto que era claramente distinto de los genes H3 contemporáneos de virus equinos aislados en 2002 y 2003 (Figura 1B). El análisis filogenético y comparaciones de secuencias de nucleótidos por pares de los otros 7 segmentos genómicos apoyaron la segregación de los genes caninos como un sublinaje distinto más cercanamente relacionado con el linaje de virus equino (datos no mostrados y Tabla 4). El agrupamiento de los genes de la gripe canina como un grupo monofilético separado de gripe equina también se vio apoyado por la presencia de 4 cambios de aminoácidos distintos en la HA (Tabla 2). Junto con los resultados serológicos de 2003 y 2004, estos datos son coherentes con un acontecimiento de transmisión de un solo virus de caballos a perros con propagación horizontal posterior del virus en la población de galgos. Sin embargo, introducciones repetidas de este linaje único de virus de la gripe a partir de una especie portadora no identificada no puede excluirse formalmente, aunque sea improbable.

La HA viral es un determinante crítico de especificidad de especies hospedadoras de virus de la gripe (Suzuki *et al.*, 2000). Para identificar restos dentro de HA que puedan estar asociados con la adaptación al hospedador canino, los inventores compararon la secuencia de aminoácidos deducida de HA caninas con las de virus equinos contemporáneos. Cuatro cambios de aminoácidos diferencian las secuencias de aminoácidos consenso de HA equina y canina madura: N83S, W222L, I328T y N483T (véase Tabla 2). Los virus caninos tienen una delección de aminoácidos en comparación con las secuencias equinas consenso. Por lo tanto, la posición de aminoácido 7 en la secuencia equina de HA es la posición 6 en la secuencia canina de HA, la posición de aminoácido 29 en la secuencia equina de HA es la posición 28 en la secuencia canina de HA, la posición de aminoácido 83 en la secuencia equina de HA es la posición 82 en la secuencia canina de HA, etc. Por lo tanto, los cuatro aminoácidos sustituidos están la posición 82, 221, 327 y 482 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 33 y SEC ID N°: 34. La sustitución de asparagina con serina en la posición de secuencia consenso 83 es un cambio de importancia funcional desconocida, puesto que se encuentran diversos restos polares en moléculas H3 de otras especies. La isoleucina estrictamente conservada en la posición de secuencia consenso 328 cerca del sitio de escisión de la HA H3 se ha reemplazado por treonina. El papel principal de escisión de HA por proteasas del hospedador en patogénesis sugiere que este cambio merece un estudio adicional. La sustitución de triptófano por leucina en la posición de secuencia consenso 222 es bastante notable debido a que representa un cambio no conservativo adyacente al bolsillo de unión de ácido siálico que podría modular la función receptora (Weis *et al.*, 1998). Resulta interesante que la leucina en la posición 222 no es única de HA H3 canina puesto que se encuentra típicamente en los subtipos de HA H4, H8, H9 y H12 (Nobusawa *et al.*, 1991; Kovacova *et al.*, 2002). La sustitución de leucina puede ser más compatible con la especificidad del virus por hospedadores mamíferos, puesto que se ha informado de infecciones de cerdos con virus de subtipo H4 (Karasin *et al.*, 2000) y seres humanos y cerdos con subtipo H9 (Peiris *et al.*, 1999). La sustitución de asparagina con treonina en la posición de secuencia consenso 483 dio como resultado la pérdida de un sitio de glicosilación en la subunidad HA2 que se conserva en todos los subtipos de HA (Wagner *et al.*, 2002). Aunque la importancia de estos cambios de aminoácidos en la HA para adaptación de un virus equino a perros aún debe determinarse, se han observado cambios de aminoácidos similares previamente en asociación con transferencia entre especies (Vines *et al.*, 1998; Matrosovich *et al.*, 2000). En las Tablas 19 a 25 se muestran diferencias de aminoácidos entre otras proteínas virales de la gripe de la invención y secuencias consenso equinas.

La fuente del virus de la gripe equina que inicialmente infectó a los galgos de carrera sigue siendo especulativa. Las perreras en los canódromos no se localizan cerca de caballos o hipódromos, lo que sugiere que el contacto entre galgos y caballos con supresión no es una explicación suficiente para los múltiples brotes en diferentes estados en 2004. Una fuente de exposición potencial al virus equino es la alimentación con carne de caballo a galgos, cuya

dieta se complementa con carne cruda proporcionada por plantas empaquetadoras que entregan cadáveres, incluyendo caballos que podrían portar gripe. Los precedentes para este modo de infección incluyen informes de transmisión entre especies de virus de la gripe aviar H5N1 a cerdos y felinos de zoológico alimentados con cadáveres de pollos infectados (Webster, 1998; Keawcharoen *et al.*, 2004; Kuiken *et al.*, 2004). Aunque ésta es una vía plausible para la introducción inicial de gripe equina en perros, no explica los múltiples brotes de gripe recientes en miles de perros en diferentes estados. El estudio de inoculación experimental de los inventores demostró la presencia de virus en las fosas nasales y orofaringe de perros, aunque a titulaciones modestas. No obstante, estos resultados indican que la difusión es posible, y que la transmisión de perro a perro de virus por aerosoles de gotas grandes, fomites o contacto directo de mucosa podría desempeñar un papel en la epizootiología de la enfermedad.

La transferencia entre especies de un virus de la gripe de mamífero completo a una especie de mamífero no relacionada es un acontecimiento poco habitual. Estudios anteriores han proporcionado pruebas serológicas o virológicas limitadas, pero no ambas, de infección transitoria de perros con virus de la gripe humana A (H3N2) (Nikitin *et al.*, 1972, Kilbourne, *et al.*, 1975; Chang *et al.*, 1976; Houser *et al.*, 1980). Sin embargo, no hubo pruebas de circulación prolongada en el hospedador canino. Aunque la transferencia directa de virus de la gripe porcina de cerdos a personas está bien documentada (Dacso *et al.*, 1984; Kimura *et al.*, 1998; Patriarca *et al.*, 1984; Top *et al.*, 1977), no existen pruebas de la adaptación de los virus porcinos en los hospedadores humanos. En este informe, los inventores proporcionan pruebas virológicas, serológicas y moleculares de transmisión entre especies de un virus de la gripe equina A (H3N8) completo a otra especie de mamífero, el perro. Las sustituciones de aminoácidos únicas en la HA de virus canino, junto con la confirmación serológica de infección de perros en múltiples estados de los Estados Unidos, sugieren adaptación del virus al hospedador canino. Puesto que los perros son un animal de compañía primario para los seres humanos, estos hallazgos tienen implicaciones para la salud pública; los perros pueden proporcionar una nueva fuente de transmisión de nuevos virus de la gripe A a seres humanos.

Tabla 1. Respuesta de anticuerpos a A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8).

Respuesta	Perros Enfermos (11) ^a		Contactos Sanos (16) ^b	
	HI ^c	SN ^d	HI	SN
Seroconversión (%) ^e	73	73	38	50
Seropositivo (%) ^f	82	82	100	100
Titulación media geométrica ^g	329	424	268	431

^a Número de perros con señales clínicas de enfermedad.
^b Número de perros asintomáticos alojados en contacto con perros clínicamente enfermos.
^c Ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI) usando A/Canino/Florida/43/2004.
^d Ensayo de microneutralización (MN) usando virus A/Canino/Florida/43/2004.
^e Porcentaje de perros con un aumento al menos 4 veces de titulación de anticuerpos en sueros emparejados agudos y convalecientes.
^f Porcentaje de perros con una titulación de anticuerpos positiva (titulación de HI ≥32: titulación de MN ≥80) en el suero convaleciente.
^g Titulación de anticuerpos media geométrica para el suero convaleciente.

Tabla 2. Diferencias de aminoácidos entre las hemaglutininas H3 canina y equina

H3 equina consenso	Can/FL/03	Can/FL/04	Can/TX/04	Importancia potencial funcional
G7*	D	-†	-	D también se encuentra en HA H3 humana y de pato
I29	-	M	M	I se conserva en HA H3 de todas las especies
N83	S	S	S	Diversos aminoácidos polares presentes en esta posición en HA H3 de otras especies
S92	-	N	-	N está presente en algunas HA H3 de pato
L118	-	-	V	L se conserva en todas las HA H3
W222	L	L	L	W se conserva en la mayoría de HA H3 de todas las especies; localizada cerca del sitio de unión al receptor
A272	V	A	V	V está presente en algunos aislados equinos recientes.
I328	T	T	T	T se conserva estrictamente en todas las HA H3 aviarias, porcinas o humanas
N483	T	T	T	N aparece en todos los H3 y otros subtipos de HA. El reemplazo da como resultado pérdida de un sitio de glicosilación.
K541	-	R	-	Cambio conservativo de aminoácido básico

* Resto de aminoácido (código de una letra) y posición en la HA H3 madura. El código de aminoácidos es: A=alanina, D=ácido aspártico, G=glicina, I=isoleucina, K=lisina, M=metionina, N=asparagina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptófano.
† Indica ausencia de cambio de las HA H3 equinas consenso.

Tabla 3. Inhibición de hemaglutinación de un aislado de virus por antisueros de referencia para diferentes subtipos de HA

Antisueros de referencia	Especificidad de HA	Titulación de HI ^a
Puerto Rico/8/34	H1	5
Porcino/Iowa15/30	H1	5
Singapur/01/57	H2	5
Shanghai/11/87	H3 ^b	5
Equino/Miami/1/63	H3	160
Pato/Checoslovaquia/56	H4	5
Charrán/Sudáfrica/61	H5	5
Pavo/Massachusetts/65	H6	5
Gripe Aviar/Holandés/27	H7	5
Gripe Aviar/Rostock/34	H7	5
Equino/Praga/1/56	H7	5
Pavo/Ontario/6118/68	H8	5
Codorniz/Hong Kong/G1/97	H9 ^b	5
Pollo/Hong Kong/G9/97	H9 ^b	5
Pollo/Alemania/49	H10	5
Pato/Inglaterra/56	H11	5
Gaviota/Maryland/704/77	H13	5
Suero de oveja normal	-	5
Suero de hurón normal	-	5

^a Titulación de inhibición de hemaglutinación para aislado de virus del perro n° 43.
^b Se produjeron antisueros policlonales en hurones, mientras que todos los otros antisueros se produjeron en ovejas o cabras.

Tabla 4. Homología de secuencia de genes de A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8) para cepas equinas, aviarias, porcinas y humanas de gripe A

Gen	Equina	Aviar	Porcina	Humana
PB2 DQ124147	96,9 (98,7) ^a Eq/ Kentucky/2/8 M73526	88,6 (96,8) Ánade/ Alberta/98/85 AY633315	87,9 (96,8) Por/ Ontario/01911-1/99 AF285892	86,2 (96,4) PR/8/34 (HK/213/03) AF389115 (AY576381)
PB1 DQ124148	97,1 (98,8) Eq/ Tennessee/5/86 M25929	83,9 (97,1) Po/ Columbia Británica/04 (Gaviota/Md/704/77) AY61675 (M25933)	83,9 (97,1) Por/ Corea/S109/04 (Por / Saskatch/ 18789/02) AY790287 (AY619955)	83,9 (97,1) WSN/33 (Sing/1/57) J02178 (M25924)
PA DQ124149	96,3 (97,5) M26082 Eq/Tennessee/5/86	87,0 (94,3) Po/Chile/ 4591/02 (Avestruz/SA/ 08103/95) AY303660 (AF508662)	84,3 (94,6) Por/ Hong Kong/126/02 M26081	83,8 (93,4) Taiwán/ 2/70 (Vietnam/ 1203/04) AY21 0199 (AY818132)
HA (H3) DQ124190	97,4(97,1) Eq/FL/ 1/93 L39916	80,7 (89,0) Pt/ Noruega/1/03 AJ841293	80,0 (87,7) Por/ Ontario/42729a/01 AY619977	81,8 (87,9) HK/1/68 AF348176
NP DQ124150	96,6 (97,9) Eq/ Tennessee/5/86 M30758	87,9 (95,1) Po/Chile/ 176822/02 AY303658	85,4 (93,5) Por / Ontario/42729a/0 1 (Por/Fujian/1/2003) AY619974 (AY747611)	84,7 (93,0) HK/ 1073/99 (Hong Kong /538/97) AF255742 (AF255751)
NA (N8) DQ124151	96,8 (97,0) Eq/ Tennessee/5/86 L06538	84,0 (85,2) Pt/NJ/ 2000 L06583	na ^b	na ^b
M DQ124152	97,9 (95,7) Eq/ Tennessee/5/86 (Eq/ Kentucky/92) M63529 (AF001683)	94,1 (94,0) Pv/Mn/ 833/80 AF001683	93,7 (93,5) Por/ Saskatchewan/ 18789/02 M63527	91,2 (95,4) WSN/33 (Hong Kong/ 1073/99) J02177 (AJ278646)

Tabla 4. Homología de secuencia de genes de A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8) para cepas equinas, aviarias, porcinas y humanas de gripe A

Gen	Equina	Aviar	Porcina	Humana
NS DQ124153	97,5 (95,7) Eq/Tn/ 5/86 (Eq/Kentucky/ 92) M80973 (AF001671)	92,0 (90,4) An/NY/ 6750/78 M80945	91,1 (89,1) Por/ China/8/78 (Por/ Corea/s452/04) M80968 (AY790309)	91,4 (90,0) Brevig Mission/1/18 AF333238

^a Porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos y aminoácidos (entre paréntesis) de genes de A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8) con el gen más homólogo de aislados de virus de la gripe de la especie, seguido de los números de acceso de base de datos de secuencia de Genbank.

^b No aplicable: No se ha informado nunca de neuraminidasa N8 en virus humanos o porcinos.

Tabla 5. Titulaciones de anticuerpos para A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8) en suero de galgos recogido de 1996 a 2003.

	Año ^a					
	1996	1997	1998	2000	2002	2003
Nº de perros ensayados	8	6	19	4	6	22
Nº de perros seropositivos	0	0	0	1	2	6
Titulaciones de anticuerpo ^b				512	232.524	280-2242

^a El año de recogida de la muestra de suero de galgos de carrera en Florida.

^b Titulaciones de anticuerpo de ensayo de microneutralización para perros seropositivos, incluyendo el intervalo para los seis perros seropositivos de 2003.

Tabla 6. Respuesta de anticuerpo a A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8) en galgos de carrera en 4 pistas de Florida en junio de 2004.

Respuesta	Pista A	Pista B	Pista C	Pista D
Número de perros ensayados ^a	37	10	22	25
Seroconversión (%) ^b	46	90	100	64
Seropositivo (%) ^c	100	100	100	100
Titulación media geométrica ^d	401	512	290	446

^a Número de perros clínicamente enfermos ensayados por HI usando A/Canino/Florida/43/2004 (H3N8).

^b Porcentaje de perros con aumento ≥ 4 veces de titulación de anticuerpos entre sueros agudos y convalecientes.

^c Porcentaje de perros con una titulación de anticuerpos positiva (titulación de HI >16) en los sueros convalecientes.

^d Titulación de anticuerpos media geométrica para los sueros convalecientes.

Materiales y métodos para los Ejemplos 7-11

5

Tejidos caninos

Se realizaron exámenes post mórtem por el Servicio de Patología Anatómica en el Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida en 6 perros de raza mestiza que murieron en abril/mayo de 2005 durante un brote de gripe en una instalación de refugio en el noreste de Florida, y en un perro Yorkshire Terrier mascota que murió en mayo de 2005 durante un brote de gripe en una clínica veterinaria en el sureste de Florida. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 5 μm con hematoxilina y eosina para diagnóstico histopatológico. Los tejidos no fijados se almacenaron a -80 °C hasta sus análisis virológicos.

15

Extracción de ARN de muestras de tejido canino

Se descongelaron tejidos pulmonares congelados de cada uno de los 7 perros y se homogeneizaron en medio esencial mínimo (MEM) complementado con albúmina de suero bovino 0,5% (BSA) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina) usando una picadora de tejido desechable (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). Se extrajo ARN total usando un kit comercial (Kit RNeasy[®] Mini, QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyó en un volumen final de 60 μl de tampón. También se extrajo ARN total de tejido pulmonar recogido de perros sin enfermedad respiratoria.

RT-PCR en tiempo real

Se realizó una RT-PCR en tiempo real cuantitativa de una etapa en ARN total extraído de las muestras de tejido canino usando el Kit de RT-PCR de sonda QuantiTect[®] que contiene ROX como un colorante de referencia pasivo (QIAGEN Inc., Valencia, CA). En resumen, se usaron 2 conjuntos de cebadores-sonda para detección de secuencias de gripe A en cada muestra (**Tabla 7**). Un conjunto de cebador-sonda fue selectivo para secuencias génicas de hemaglutinina (H3) canina. El otro conjunto de cebador-sonda se dirigió a una región altamente

30

conservada del gen de matriz (M) de virus de la gripe de tipo A. Para cada reacción de RT-PCR en tiempo real, se añadieron 5 µl de ARN total extraído a una mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de Mezcla Maestra de RT-PCR de sonda QuantiTect® 2X, 0,25 µl de mezcla RT QuantiTect®, cebadores directo e inverso (concentración final 0,4 µM para cada uno), sonda (concentración final de 0,1 µM) y agua sin RNasa en un volumen final de 25 µl. Los Reactivos de Control de ARN Ribosomal TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detección de ARNr 18S como un control interno endógeno con respecto a la presencia de ARN extraído de las muestras de tejido canino.

Se realizó RT-PCR en tiempo real de una etapa cuantitativa en las mezclas de reacción en un Sistema QPCR Mx3000P® (Stratagene, La Jolla, CA). Las condiciones de ciclación incluyeron una etapa de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos, una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos para activar la ADN polimerasa HotStarTaq®, y amplificación durante 40 ciclos. Cada ciclo de amplificación incluyó desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos seguido de hibridación/extensión a 60 °C durante 1 minuto. Las señales fluorescentes FAM (longitud de onda de emisión 518 nm) y VIC (longitud de onda de emisión 554 nm) se registraron a final de cada ciclo. El ciclo umbral (Ct) se determinó estableciendo la fluorescencia umbral (dR) a 1000 en cada experimento individual. Para la adquisición de datos y el análisis se usó el programa de software Mx3000P® versión 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA). Las muestras se consideraron positivas para virus de gripe A cuando el ciclo umbral (Ct) para el gen H3 o M fue 3 unidades más pequeño que el Ct para tejidos pulmonares de perros sin enfermedad respiratoria. El control positivo consistió en amplificación de ARN extraído de virus A/canino/FL1242/03 (H3N8).

Aislamiento de virus en células MDCK

Se descongelaron tejidos pulmonares congelados de cada uno de los 7 perros y se homogeneizaron en 10 volúmenes de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 0,5% (BSA) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina). Se retiraron los residuos sólidos por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas en DMEM complementado con tripsina tratada con TPCK 1 µg/ml (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina). Las células se cultivaron en matraces de 25 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ 5%. Los cultivos se observaron diariamente con respecto a cambios morfológicos y se recogieron a los 5 días después de inoculación. Los cultivos recogidos se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en células MDCK nuevas como se ha descrito para la inoculación inicial; se realizaron dos pases adicionales para muestras que no mostraron pruebas de virus de la gripe por hemaglutinación o RT-PCR. La actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados se determinó usando glóbulos rojos de pavo 0,5% como se ha descrito previamente (Burleson, F. *et al.*, 1992; Kendal, P. *et al.*, 1982). Se realizó RT-PCR como se describe posteriormente.

Aislamiento de virus en huevos de pollo embrionados

Se prepararon homogeneizados a partir de tejidos pulmonares congelados como se ha descrito anteriormente para inoculación de células MDCK. Los homogeneizados (0,2 ml) se inocularon en el saco alantoideo de huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Después de 48 horas de incubación a 35 °C, los huevos se enfriaron a 4 °C durante una noche antes de recoger el fluido alantoideo. La actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados se determinó usando glóbulos rojos de pavo 0,5% como se ha descrito previamente (Burleson, F. *et al.*, 1992; Kendal, P. *et al.*, 1982). Se realizó RT-PCR como se describe posteriormente. Se realizaron dos pases adicionales en huevos embrionados que no mostraron pruebas de virus de la gripe después de la inoculación inicial.

RT-PCR, secuenciación de nucleótidos y análisis filogenéticos

Se extrajo ARN viral de sobrenadante de MDCK o fluido alantoideo usando el Kit QIAamp® de ARN Viral Mini (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN viral se transcribió de forma inversa a ADNc usando el Kit de RT-PCR de Una Etapa QIAGEN® (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó amplificación por PCR de la región codificante de los 8 genes virales de la gripe en el ADNc como se ha descrito previamente (Klimov, A. *et al.*, 1992b), usando conjuntos de cebadores específicos para genes universales (secuencias de los cebadores disponibles bajo demanda). Los amplicones de ADN resultantes se usaron como moldes para secuenciación automática en el secuenciador de ADN automático ABI PRISM® 3100 usando química de terminador de colorante de secuenciación cíclica (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de nucleótidos se analizaron usando el Lasergene 6 Package® (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Se usó el programa de software PHYLIP Versión 3.5® para estimar las filogenias y calcular los valores de bootstrap de las secuencias de nucleótidos (Felsenstein, J., 1989). Los árboles filogenéticos se compararon con los generados por análisis de unión a vecinos con el modelo Tamura-Nei implementado en el programa MEGA® (Kumar, S. *et al.*, 2004) y se confirmó por el programa PAUP® 4.0 Beta (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA).

Ensayo de inhibición de hemaglutinación

Se incubaron muestras de suero con enzima destructora de receptor (RDE, DENKA SEIKEN Co., Ltd., Tokio, Japón) (1 parte de suero: 3 partes de RDE) durante 16 horas a 37 °C antes de inactivación por calor durante 30 minutos a

56 °C. Se cultivó virus de la Gripe A/Canino/Jacksonville/05 (H3/N8) en células MDCK durante 72 horas a 37 °C en CO₂ 5%. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de virus, se clarificaron por centrifugación y se almacenaron a -80 °C. Todos los otros virus usados en el ensayo HI se cultivaron en huevos de pollo embrionados de 10 días de los que se recogió fluido alantoideo y se almacenó a -80 °C. El ensayo HI se realizó como se ha descrito previamente (Kendal, P. *et al.*, 1982). En resumen, se añadieron 4 unidades de hemaglutinación de virus en 25 µl a un volumen igual de suero diluido en serie en placas de plástico de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió un volumen igual de eritrocitos de pavo 0,5% y las titulaciones de hemaglutinación se estimaron visualmente después de 30 minutos. El criterio de valoración de titulación de HI se definió como la última dilución de suero que inhibía completamente la hemaglutinación.

EJEMPLO 7 – CASOS CLÍNICOS

En abril y mayo de 2005, se produjo un brote de enfermedad respiratoria previamente descrito (Crawford, P.C. *et al.*, 2005) en perros alojados en una instalación de refugio en el noreste de Florida. El brote implicó al menos 58 perros que variaban en edad de 3 meses a 9 años, e incluyó perros de raza pura así como razas mestizas. Las señales clínicas más habituales fueron descarga nasal purulenta y una tos durante 7 a 21 días. De los 43 perros que tuvieron enfermedad clínica durante ≥7 días, 41 tuvieron titulaciones de anticuerpo de HI para canino/FL4/04 (H3N8) que variaba de 32 a >1024. Al menos 10 perros progresaron a neumonía, de los que 6 fueron sacrificados. Estos 6 perros de raza mixta incluían 3 machos y 3 hembras que variaban en edad de 4 meses a 3 años. La duración de las señales clínicas varió de 2 a 10 días en el momento del sacrificio. En la examen post mórtem, estos perros tenían congestión pulmonar y edema. El examen histológico del tracto respiratorio reveló rinitis, traqueítis, bronquitis, bronquiolitis y bronconeumonía supurante. Hubo necrosis de células epiteliales y erosión en la tráquea, bronquios, bronquiolos y glándulas bronquiales. Los tejidos respiratorios estaban infiltrados por neutrófilos y macrófagos.

En mayo de 2005, se produjo un brote de enfermedad respiratoria en 40 perros mascotas en una clínica veterinaria en el sureste de Florida. Las señales clínicas más habituales fueron descarga nasal purulenta y una tos durante 10 a 30 días. De los 40 perros, 17 fueron seropositivos para canino/FL/04 (H3N8) con titulaciones de anticuerpo de HI que variaban de 32 a >1024. Se produjo seroconversión en 10 perros para los que estaban disponibles sueros emparejados agudos y convalecientes. Tres perros progresaron a neumonía. Uno de estos perros, un Yorkshire Terrier macho de 9 años de edad, murió 3 días después de la aparición de señales clínicas. Este perro tenía traqueobronquitis, edema y congestión pulmonar y bronconeumonía grave. De forma similar a los 6 perros del refugio, hubo necrosis celular epitelial y erosión de las vías respiratorias e infiltraciones de neutrófilos en los tejidos.

EJEMPLO 8 – RT-PCR EN TIEMPO REAL Y AISLAMIENTO VIRAL

Se analizaron tejidos pulmonares de los 7 perros por ensayos de RT-PCR en tiempo real cuantitativos que detectan el gen M de gripe de tipo A y el gen H3 de virus de gripe A H3N8 canina. Los pulmones de los 7 perros fueron positivos tanto para el gen M de gripe A como para el gen de gripe H3 canina (Tabla 8). Después de 3 pases en células MDCK, se aisló virus de gripe A subtipo H3N8 de los pulmones de un perro de refugio que murió después de 3 días de neumonía. Este virus se llamó A/canino/Jacksonville/05 (H3N8) (canino/Jax/05). Después de 2 pases en huevos de pollo embrionados, se recuperó virus de gripe A subtipo H3N8 de los pulmones del perro mascota que también murió después de 3 días de neumonía. Este virus se denominó A/canino/Miami/05 (H3N8) (canino/Miami/05).

EJEMPLO 9 – ANÁLISIS GENÉTICOS DE LOS AISLADOS DE GRIPE CANINA A H3N8

Los análisis de secuencia de canino/Jax/05 y canino/Miami/05 revelaron que sus genes de hemaglutinina (HA) eran 98% idénticos a los aislados de canino/FL/04, canino/TX/04 y canino/Iowa/05 recuperados de los pulmones de galgos de carrera que murieron de neumonía durante brotes de gripe en las pistas en 2004 y 2005 (Crawford, P.C. *et al.*, 2005; Yoon K-Y. *et al.*, 2005). Además, los genes de HA de canino/Jax/05 y canino/Miami/05 fueron 98% idénticos a virus de la gripe equina contemporáneos aislados después del año 2000. Las comparaciones filogenéticas de los genes de HA mostraron que los virus canino/Jax/05 y canino/Miami/05 se agrupaban con los aislados de galgo canino/FL/04, canino/TX/04 y canino/Iowa/05 y aislados equinos contemporáneos, formando un grupo definido de los virus equinos más antiguos aislados a principios de los años 90 (Figura 4). Además, los aislados de virus canino/Jax/05, canino/Miami/05 y canino/Iowa/05 estaban más cercanamente relacionados a canino/Tx/04 que a canino/FL/04 o canino/FL/03. Los aislados de 2005 formaron un subgrupo que parece ramificarse de los virus caninos anteriores de 2003 y 2004 con diferencias en aproximadamente 10 sitios informativos de parsimonia. Estas diferencias apoyan la hipótesis de que el virus de la gripe canina se transmite de forma horizontal de perro a perro en lugar de reintroducirse periódicamente desde una fuente externa. La acumulación de mutaciones de 2003 a 2005 ilustra el proceso continuado de adaptación que el virus debe experimentar después de transmitirse a un nuevo hospedador, como se espera que haya sucedido para los virus de gripe canina.

EJEMPLO 10 – ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LOS AISLADOS DE GRIPE CANINA A H3N8

Hubo sustituciones de aminoácidos conservados en los 6 aislados caninos que los diferenciaban de virus de gripe equina contemporáneos (Tabla 9). Estas sustituciones conservadas fueron I15M, N83S, W222L, 1328T y N483T. Las comparaciones filogenéticas de la proteína HA madura mostraron que los virus canino/Jax/05, canino/Miami/05 y canino/Iowa/05 formaban un subgrupo con el aislado canino/TX/04 (Figura 4). Hubo 3 cambios de aminoácidos (L118V, K261N y G479E) que diferenciaron este subgrupo de los otros virus caninos (Tabla 9). Hubo 2 cambios de aminoácidos (F79L y G218E) que diferenciaron los aislados de 2005 de su raíz de canino/TX/04. Además, los aislados de 2005 de perros no galgos, canino/Jax/05 y canino/Miami/05, difirieron del aislado de galgo de canino/Iowa/05 en un cambio de aminoácido, R492K. Finalmente, canino/Jax/05 difirió de canino/Miami/05 en un solo aminoácido, S107P. En todos los demás virus equinos y caninos H3N8, S se conserva en la posición 107 excepto para A/Equino/Jilin/1/89 que tiene una T (Guo Y. *et. al.*, 1992).

EJEMPLO 11 – ANÁLISIS ANTIGÉNICOS DE LOS AISLADOS DE GRIPE CANINA A H3N8

Se realizaron ensayos de inhibición de hemaglutinación (HI) usando un panel de antígenos de virus de la gripe equina contemporáneos y más antiguos y los virus de gripe canina, y suero recogido en 2005 de caballos y perros que se habían infectado con virus de la gripe (Tabla 10). También se incluyó suero de hurones inmunizados contra canino/FL/04 en los análisis. Las titulaciones de anticuerpo de HI en suero equino fueron de 8 a 16 veces mayores cuando se ensayaron con virus equinos contemporáneos en comparación con aislados más antiguos, pero se redujeron en al menos 4 veces cuando se ensayaron con los virus caninos. El suero canino no fue reactivo con los virus equinos más antiguos, pero las titulaciones de anticuerpo aumentaron 4 veces cuando se ensayaron con aislados equinos contemporáneos y aislados caninos. Esto también se observó para el suero de hurones inmunizados contra virus de la gripe canina. Estos patrones serorreactivos demostraron la similitud antigénica entre los virus de gripe canina y virus de gripe equina contemporáneos y fueron coherentes con los análisis filogenéticos. Las titulaciones de anticuerpos en sueros equinos, caninos, y de hurón para el aislado de canino/Miami/05 fueron similares a las de los aislados caninos de 2003 y 2004. Sin embargo, las titulaciones fueron de 2 a 4 veces menores para el aislado de canino/Jax/05. Esto sugiere que canino/Jax/05 es antigénicamente distinto de los otros aislados caninos, lo que puede estar relacionado en parte con el cambio de un solo aminoácido en la posición 107 en la HA madura.

Tabla 7. Sondas y cebadores para análisis de RT-PCR en tiempo real cuantitativa para el gen de la matriz de virus de gripe A y el gen H3 de gripe canina A (H3N8).

Cebador	Diana	Secuencia	Aplicación
Ca-H3-F387	H3 (nt 387-406)	5'-tatgcatcgctccgatccat-3' (SEC ID N°: 79)	Cebador directo para H3
Ca-H3-R487	H3 (nt 487-467)	5'-gctccacttctccgtttga-3' (SEC ID N°: 80)	Cebador inverso para H3
Ca-H3-P430	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagaggattcacatggacag -BHQ1 (SEC ID N°: 81)	Sonda TaqMan®
FluA-M-F151	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaagacc-3 ^a (SEC ID N°: 82)	Cebador directo para M
FluA-M-R276	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaakcgtcta-3' (SEC ID N°: 83)	Cebador inverso para M
FluA-M-P218	M (nt 218-235)	FAM -acgcTcaccgTgcccAgt- BHQ1 ^b (SEC ID N°: 84)	Sonda TaqMan®

^a La letra r subrayada representa nucleótido a o g y la letra k subrayada representa nucleótido g o t.

^b Las letras en mayúsculas representan restos de ácido nucleico bloqueados.

Tabla 8. RT-PCR en tiempo real cuantitativa y aislamiento viral realizado en tejidos pulmonares de perros que murieron de neumonía durante brotes de enfermedad respiratoria en un refugio y clínica veterinaria en Florida.

ID del perro	Localización	Duración de enfermedad clínica	RT-PCR en tiempo real		Aislamiento del Virus
			M (Ct)	HA (Ct)	
Control positivo de A/canino/FL/242/03			28,15	27,36	
1079	Refugio (NE FL)	2 días	29,81	28,84	ninguna
1078	Refugio (NE FL)	3 días	30,37	29,71	3º pase de MDCK
318	Refugio (NE FL)	9 días	33,89	32,97	ninguna
320	Refugio (NE FL)	10 días	39,44	37,09	ninguna
319	Refugio (NE FL)	6 días	33,87	32,23	ninguna
1080	Refugio (NE FL)	6 días	38,87	38,23	ninguna
374	Clínica veterinaria (SE FL)	3 días	24,05	22,65	2º pase de huevo

Tabla 9. Comparación de aminoácidos de la HA madura para virus de gripe canina y virus de gripe equina contemporáneos

		Aminoácido																	
		7	15	54	78	79	83	92	107	118	159	218	222	261	328	479	483	492	541
A/equino/KY/5/02		G	I	N	V	F	N	S	S	L	N	G	W	K	1	G	N	R	K
A/equino/MA/213/03		-	-	-	A	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-
A/equino/OH/1/03		D	-	K	A	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-
A/canino/FL/242/03		-	M	K	A	-	S	-	-	-	S	-	L	-	T	-	T	-	-
A/canino/FL/43/04		-	M	K	A	-	S	N	-	-	S	-	L	-	T	-	T	-	R
A/canino/TX/1/04		-	M	K	A	-	S	-	-	V	S	-	L	N	T	E	T	-	-
A/canino/Iowa/05		-	M	K	A	L	S	-	-	V	S	E	L	N	T	E	T	-	-
A/canino/Miami/05		-	M	K	A	L	S	-	-	V	S	E	L	N	T	E	T	K	-
A/canino/Jacksonville/05		-	M	K	A	L	S	-	P	V	S	E	L	N	T	E	T	K	-

Tabla 10. Titulaciones de anticuerpos en suero equino, canino y de hurón para virus de gripe equina contemporáneos y más antiguos y virus de gripe canina.			
Antígenos	Titulaciones de anticuerpo de suero^a		
	Equino	Canino	Hurón^b
equino/Miami/63	40	<10	16
equino/Ky/86	40	40	32
equino/KY/92	40	<10	32
equino/NY/99	320	40	128
equino/KY/05/02	320	160	256
equino/MA/213/03	640	160	512
equino/OH/01/03	640	160	512
canino/FL/03	160	160	512
canino/FL/04	160	80	512
canino/Tx/04	160	160	512
canino/Miami/05	160	80	256
canino/Jax/05	40	40	128

^a Las titulaciones de anticuerpo se determinaron en un ensayo de inhibición de hemaglutinación realizado con diluciones en serie de suero equino, canino o de hurón y los virus enumerados en la columna de antígenos.
^b Suero de hurones inmunizados con virus canino/FL/04.

Materiales y métodos ejemplares para los Ejemplos 12-15

Inóculo de virus de gripe canina

5 El inóculo de virus se preparó mediante inoculación de células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) con una reserva de A/canino/FL/43/04 (H3N8) que representa el pase 3 del aislado original previamente descrito (Crawford *et al.*, 2005). Las células MDCK inoculadas en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con tripsina tratada con TPCK 1 µg/ml (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina) se cultivaron en matraces de 250 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ 5%. Los cultivos se observaron diariamente con respecto a cambios morfológicos y se recogieron a los 10 5 días después de la inoculación. Los cultivos recogidos se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C a la espera de la inoculación de perros. Se usó una alícuota de sobrenadante para 15 determinación de titulación de virus por el método de Reed y Muench. La titulación fue 10⁷ dosis infecciosas de cultivo tisular medianas (DICT₅₀) de A/canino/Florida/43/2004 (canino/FL/04) por ml.

Inoculación experimental

20 Se usaron ocho perros mestizos criados en colonia de 4 meses de edad (Marshall BioResources, North Rose, NY) (4 machos y 4 hembras) para el estudio de inoculación experimental aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucionales de la Universidad de Florida. Los pesos corporales de los perros variaban de 13 a 17 kg. Los perros estaban sanos basándose en exámenes físicos, ensayos sanguíneos de línea basal y registro de 25 temperaturas corporales durante 2 semanas antes de la inoculación. Ninguno de los perros se había expuesto previamente a virus de gripe canina basándose en ensayos de serología realizados en muestras de suero emparejadas recogidas en el momento de la llegada a las instalaciones y 2 semanas después. Los perros se 30 anestesiaron por inyección intravenosa de propofol (Diprivan®, Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg de peso corporal hasta efecto) para intubación con tubos endotraqueales. Se inoculó a seis perros (3 machos y 3 hembras) con 10⁷ DICT₅₀ cada uno de virus canino/FL/04 en 5 ml de solución salina estéril administrada en la tráquea distal a través de un catéter de goma de diámetro pequeño insertado en el tubo endotraqueal. Se inoculó de forma simulada a dos 35 perros (1 macho y una hembra) con un volumen igual de solución salina estéril. Los perros de control inoculados con simulación se alojaron en una habitación diferente de los perros inoculados con virus y les cuidó un personal diferente. Se realizaron exámenes físicos y registros de temperatura rectal dos veces al día durante 6 días después de la inoculación (p.i.).

Recogida de hisopo faríngeo y rectal

40 Para supervisar la difusión viral, se recogieron muestras de ensayo orofaríngeas dos veces al día de cada perro los días 0 a 6 p.i. usando hisopos de poliéster (Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, PA). Los hisopos se situaron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) que contenía albúmina de suero bovino 0,5% (BSA). Se recogieron hisopos rectales de cada perro diariamente desde los días 0 a 6. Se prepararon extractos de hisopos por clarificación del medio de transporte de hisopo por centrifugación. Se ensayó una alícuota de extracto de hisopo inmediatamente con respecto a nucleoproteína de virus de gripe A usando el kit de 45 inmunoensayo comercial Directigen™ (BD, Franklin Lakes, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El extracto restante se almacenó a -80 °C a la espera de otros ensayos virológicos.

Exámenes post mórtem

El día 1 p.i. se sacrificaron un perro inoculado con simulación y un perro inoculado con virus por inoculación intravenosa de solución Beuthanasia-D® (1 ml/5 kg de peso corporal; Schering-Plough Animal Health Corp). Se sacrificó de forma similar a un perro inoculado con virus cada día desde los días 2 a 5 p.i. El día 6 p.i., se sacrificaron los perros inoculados con simulación e inoculados con virus restantes. Se analizaron exámenes post mórtem completas por uno de los investigadores (WLC). Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina y eosina para diagnóstico histopatológico o se procesaron para inmunohistoquímica como se describe posteriormente. Se presentaron tejidos de pulmón no fijados al Servicio de Microbiología/Parasitología/Serología Clínica Diagnóstica en el Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida para aislamiento e identificación bacteriana. Las muestras se cultivaron en medio no selectivo así como medio selectivo para especies de *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel, Lenexa, KS) y especies de *Mycoplasma* (Remel). Todos los cultivos se mantuvieron durante 21 días antes de que se notificara ausencia de crecimiento. Los tejidos no fijados también se almacenaron a -80 °C a la espera de análisis virológicos.

Inmunohistoquímica

Se montaron secciones tisulares de tráquea y pulmón de 5 µm desparafinadas y rehidratadas en portaobjetos Bond-Rite™ (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) y posteriormente se trataron con proteinasa K (DAKOCytomation Inc., Carpinteria, CA) seguido de reactivo de bloqueo de peroxidasa (Kit de Peroxidasa DAKO®EnVision™, DAKO Corp., Carpinteria, CA). Las secciones se incubaron con una dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal para gripe A H3 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los controles incluyeron incubación de las mismas secciones con IgG de ratón (1 mg/ml, Serotec, Inc. Raleigh, NC) e incubación del anticuerpo monoclonal con secciones de pulmón canino normales. Después del tratamiento con el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con inmunoperoxidasa secundaria y reactivos de sustrato de peroxidasa (Kit de Peroxidasa DAKO®EnVision™, DAKO Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se trataron con Clarificador nº 2 y Reactivo Azul (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), se deshidrataron y se aplicaron cubreobjetos con Permount (ProSciTech, Queensland, Australia).

Extracción de ARN de hisopos y tejidos

Se descongelaron tejidos pulmonares y traqueales de cada perro y se homogeneizaron en medio esencial mínimo (MEM) complementado con albúmina de suero bovino 0,5% (BSA) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina) usando una picadora de tejido desechable (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). Se extrajo ARN total de los homogeneizados tisulares así como extractos de hisopos orofaríngeos y rectales usando un kit comercial (kit RNeasy® Mini, QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyó en un volumen final de 60 µl de tampón.

RT-PCR en tiempo real

Se realizó una RT-PCR en tiempo real cuantitativa de una etapa en el ARN total usando el Kit de RT-PCR de Sonda QuantiTec® que contenía ROX como un colorante de referencia pasivo (QIAGEN Inc., Valencia, CA) y un conjunto de cebador-sonda que se dirigía a una región altamente conservada del gen de matriz (M) del virus de la gripe de tipo A (Payungporn S. *et al.*, 2006a; Payungporn S. *et al.*, 2006b). Para cada reacción de RT-PCR en tiempo real, se añadieron 5 µl de ARN total extraído a una mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de Mezcla Maestra de RT-PCR de Sonda QuantiTech® 2X, 0,25 µl de Mezcla de RT QuantiTech®, cebadores directo e inverso (concentración final de 0,4 µM para cada uno), sonda (concentración final de 0,1 µM) y agua sin RNasa en un volumen final de 25 µl. Los Reactivos de Control de GAPDH TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detección de GAPDH como un control interno endógeno con respecto a la presencia de ARN extraído del hisopo y muestras tisulares y como un control de normalización.

Se realizó RT-PCR en tiempo real de una etapa cuantitativa en las mezclas de reacción en un Sistema de QPCR Mx3000P® (Stratagene, La Jolla, CA). Las condiciones de ciclación incluyeron una etapa de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos, una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos para activar la ADN polimerasa HotStarTaq® y amplificación durante 40 ciclos. Cada ciclo de amplificación incluyó desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos seguido de hibridación/extensión a 60 °C durante 1 minuto. Las señales fluorescentes de FAM (longitud de onda de emisión 518 nm) y VIC (longitud de onda de emisión 554 nm) se registraron al final de cada ciclo. El ciclo umbral (Ct) se determinó estableciendo la fluorescencia umbral (dR) a 1000 en cada experimento individual. Para la adquisición y el análisis de datos se usó el programa de software Mx3000P® versión 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA). El control positivo consistió en amplificación de ARN extraído de virus A/canino/FL/242/03 (H3N8). Los resultados se normalizaron dividiendo el valor de Ct de M por el valor Ct de GAPDH correspondientes para cada muestra.

Re-aislamiento de virus de tejidos

Se descongelaron tejidos de pulmón y tráquea congelados de perros inoculados con virus y se homogeneizaron en 10 volúmenes de DMEM complementado con BSA 0,5% y antibióticos. Se retiraron residuos sólidos por centrifugación y se inocularon sobrenadantes en células MDCK cultivadas en DMEM complementado con tripsina tratada con TPCK 1 µg/ml (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y antibióticos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en matraces de 25 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada que tenía CO₂ 5%. Los cultivos se observaron diariamente con respecto a cambios morfológicos y se recogieron a los 5 días después de la inoculación. Los cultivos recogidos se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en células MDCK nuevas como se ha descrito para la inoculación inicial; se realizaron dos pases adicionales para muestras que no mostraron pruebas de virus de la gripe por hemaglutinación o RT-PCR. La actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados se determinó usando glóbulos rojos de pavo 0,5% como se ha descrito previamente (Crawford *et al.*, 2005). Se realizó RT-PCR como se describe posteriormente.

RT-PCR, secuenciación de nucleótidos y análisis filogenéticos

Se extrajo ARN viral de sobrenadante de MDCK usando el Kit de ARN Viral QIAamp[®] Mini (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN viral se transcribió de forma inversa a ADNc usando el Kit de RT-PCR QIAGEN[®] OneStep (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó amplificación por PCR de la región codificante de los 8 genes de virus de la gripe en el ADNc como se ha descrito previamente (Crawford *et al.*, 2005) usando conjuntos de cebadores específicos de genes universales (las secuencias de cebadores están disponibles bajo demanda). Los amplicones de ADN resultantes se usaron como moldes para secuenciación automática en el secuenciador de ADN automático ABI PRISM[®] 3100 usando química de terminador de colorante de secuenciación cíclica (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se analizaron las secuencias de nucleótidos usando el Láser-gene 6 Package[®] (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Las secuencias de nucleótidos para virus recuperadas de perros infectadas se compararon con las secuencias del virus en el inóculo para determinar si se había producido cualquier cambio durante la replicación en el tracto respiratorio.

EJEMPLO 12-ENFERMEDAD CLÍNICA

Los 6 perros inoculados con virus desarrollaron una fiebre transitoria (temperatura rectal ≥ 39 °C) durante los primeros 2 días p.i., pero ninguno mostró señales respiratorias tales como tos o descarga nasal durante el periodo de observación de 6 días. Los perros inoculados con simulación permanecieron clínicamente sanos.

EJEMPLO 13-DIFUSIÓN VIRAL

Se detectó nucleoproteína de gripe A en el hisopo orofaríngeo recogido de uno de los perros inoculados con virus a las 24 horas p.i. Los hisopos orofaríngeos recogidos de un perro a las 72, 84 y 120 horas p.i. y otro perro a las 108, 120 y 132 horas p.i., eran positivos para virus por RT-PCR en tiempo real cuantitativa (Tabla 11). El número absoluto de copias de genes M de gripe por µl de extracto de hisopo aumentó con el tiempo de 3 a 6 días p.i. No se detectaron virus en los hisopos rectales.

EJEMPLO 14-EXÁMENES POST MÓRTEM

A diferencia de la infección experimental anterior usando Beagles sin patógenos específicos (Crawford *et al.*, 2005), los perros mestizos inoculados con virus tuvieron neumonía como se demuestra por análisis globales e histológicos de los pulmones de los días 1 a 6 p.i. Además de neumonía, los perros tenían rinitis, traqueítis, bronquitis y bronqueolitis similar a la descrita en perros infectados de forma natural (Crawford *et al.*, 2005). Hubo necrosis epitelial y erosión del revestimiento de las vías respiratorias y glándulas bronquiales con infiltración de neutrófilos y macrófagos de los tejidos submucosos (Figura 5, paneles superiores). La inmunohistoquímica detectó antígeno viral H3 en las células epiteliales de bronquios, bronquiolos y glándulas bronquiales (Figura 5, paneles inferiores). No estaba presente superinfección bacteriana. Los tejidos respiratorios de los 2 perros inoculados con simulación fueron normales.

EJEMPLO 15-REPLICACIÓN VIRAL EN TRÁQUEA Y PULMONES

La tráquea y los pulmones fueron positivos para virus por RT-PCR en tiempo real cuantitativa en todos los perros de 1 a 6 días p.i. (Tabla 12). El número absoluto de copias de genes M de gripe por µl de homogeneizado de tráquea aumentó de 1 a 5 días p.i., después se redujo el día 6. El número absoluto de copias de genes M por µl de homogeneizado de pulmón se redujo de 1 a 6 p.i. En general, la tráquea contenía \geq un log₁₀ más virus que el pulmón en cada uno de los 6 días p.i.

Tabla 11. Detección de difusión viral en la orofaringe de perros mestizos inoculados con virus de la gripe canina por RT-PCR en tiempo real cuantitativa.

ID de perro	Tiempo p.i. (horas) ^a	Relación M/GAPDH ^b	Gen de matriz (copias / μ l) ^c
860	72	1,20	1,57E+02
	84	1,30	8,25E+02
	120	1,23	1,47E+03
894	108	1,17	1,17E+02
	120	1,41	1,37E+02
	132	1,27	3,74E+02

^a Tiempo en el que se recogieron hisopos orofaríngeos de los perros después de inoculación con virus A/canino/FL/43/04 (H3N8).
^b Se calcularon las relaciones de normalización dividiendo el M (Ct) por el GAPDH (Ct) para cada extracto de hisopo.
^c El número absoluto de copias de genes de matriz por μ l de extracto de hisopo.

Tabla 12. Detección de replicación viral en la tráquea y pulmón de perros mestizos inoculados con virus de la gripe canina por RT-PCR en tiempo real cuantitativa.

ID de perro	Tiempo p.i. (horas) ^a	Relación M/GAPDH ^b		Gen de matriz (copias / μ l) ^c	
		Pulmón	Tráquea	Pulmón	Tráquea
797	24	1,20	1,43	8,22E+05	3,11E+04
801	48	1,33	0,99	1,15E+05	6,52E+06
789	72	1,44	1,12	2,39E+04	1,56E+05
819	96	1,40	1,27	3,19E+04	1,43E+05
860	120	1,59	1,04	3,48E+03	1,17E+06
894	144	1,70	1,15	4,78E+02	1,50E+03

^a Tiempo en el que se recogieron los tejidos de los perros después de inoculación con virus A/canino/FL/43/04 (H3N8).
^b Se calcularon las relaciones de normalización dividiendo el M (Ct) por el GAPDH (Ct) para cada homogeneizado tisular.
^c El número absoluto de copias de genes de matriz por μ l de homogeneizado tisular.

Materiales y métodos ejemplares para el Ejemplo 16

5

Cepas de virus

Se propagaron cepas de virus de la gripe canina así como los de origen aviar, equino y humano (enumerados en la Tabla 15) en huevos embrionados o células MDCK y su infectividad se valoró por dilución de puntos finales en embriones de pollo, o ensayo en placa. Se realizó una cuantificación rápida de virus por el ensayo de hemaglutinación usando eritrocitos de pavo.

10

Muestras de ensayo de diagnóstico

Se ensayó un total de 60 tejidos de pulmón canino recogidos de casos sospechosos de enfermedad respiratoria viral durante el año 2005 con respecto a la presencia de virus de la gripe canina.

15

Extracción de ARN de muestras de tejido canino

Se homogeneizaron bloques de tejido pulmonar que pesaban entre 20 y 30 mg en una picadora de tejido desechable (Kendal). Se extrajo ARN total usando un kit comercial (Kit RNeasy Mini, Qiagen, Valencia, CA) y se eluyó en un volumen final de 60 μ l, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

20

Diseño de cebadores y sondas

25

Se realizaron múltiples alineamientos de secuencia de los genes H3 y M de diversos subtipos y de diversas especies usando el programa CLUSTAL X (Versión 1.8). Se seleccionaron cebadores y sonda de matriz (M) de las regiones conservadas de las secuencias conocidas correspondientes a diferentes subtipos de virus de gripe A, mientras que el conjunto de sonda y cebadores específicos de gen de hemaglutinina H3 se seleccionaron para coincidir específicamente con genes de virus de la gripe equina y canina A y no coincidir con los genes aviares y humanos homólogos (Tabla 13). Se usó un software de diseño de cebadores (OLIGOS Versión 9.1) y las herramientas de análisis basadas en la web proporcionadas por EXIQON (<http://Inatools.com>) para el cálculo de Tm y la predicción de la estructura secundaria así como la autohibridación. Se usó una región conservada de un gen de ARNr 18S como control interno endógeno con respecto a la presencia de ARN extraído de muestra de tejido canino. Para la detección en tiempo real de ARNr 18S en muestras de tejido se usaron los Reactivos de Ensayo TaqMan® Pre-

30

35

Desarrollado para ARNr 18S Eucariota (VIC/TAMRA) (Applied Biosystems).

Condición de RT-PCR en tiempo real

5 Se realizó una RT-PCR en tiempo real de una etapa usando el Kit de RT-PCR de Sonda Quantitect que contenía ROX como un colorante de referencia pasivo (Qiagen, Valencia, CA). En cada reacción de RT-PCR en tiempo real, se usaron 5 μ l de muestra de ARN como un molde para combinar con una mezcla de reacción que contenía 10 μ l de Mezcla Maestra de RT-PCR de Sonda QuantiTech 2X, 0,2 μ l de Mezcla de RT QuantiTech, cebadores (concentración final 0,4 μ M para el gen H3 o concentración final 0,6 μ M para el gen M), sonda (concentración final 10 0,1 μ M para el gen H3 o concentración final 0,2 μ M para el gen M) y agua sin RNasa en un volumen final de 20 μ l. Se realizó RT-PCR en tiempo real de una etapa en el sistema QPCR en Tiempo Real Mx3005P (Stratagene). Las condiciones de ciclación incluyeron una etapa de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos. Después de una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos para activar la ADN polimerasa HotStarTaq, se realizó amplificación durante 40 ciclos incluyendo desnaturalización (94 °C durante 15 segundos) e hibridación/extensión (60 °C durante 30 segundos). Se obtuvieron las señales fluorescentes de FAM (longitud de onda de emisión 516 nm para H3 y detección M) y VIC (longitud de onda de emisión 555 nm para detección de ARNr 18S) una vez por ciclo al final de la etapa de extensión. Las adquisiciones y análisis de datos del ensayo de PCR en tiempo real se realizaron usando el software Mx3005P versión 2.02 (Stratagene).

Especificidad de conjunto de cebadores/sonda de H3 para gripe canina (H3N8) y universalidad de conjunto de cebadores/sonda de M para virus de la gripe de tipo A

Para ensayar la especificidad de cada conjunto de cebadores/sonda, se usó ARN extraído de varios subtipos conocidos de virus de gripe A como un molde en el ensayo de RT-PCR en tiempo real (Tabla 15).

Patrón de ARN para determinación del rendimiento de RT-PCR en tiempo real

Se usaron los genes de virus de gripe canina A (A/canino/Florida/242/2003(H3N8)) para generar los amplicones de PCR para H3 (nt 1-487) y M (nt 1-276) usando cebadores unidos con promotor T7 (Tabla 13). Después se usaron los amplicones de PCR purificados de genes H3 y M como moldes para transcripción *in vitro* usando el Sistema de Transcripción *in vitro* T7 Riboprobe (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de los ARN transcritos se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm. Los ARN se diluyeron después en serie 10 veces variando de 10^8 a 10 copias/ μ l para realizar los ensayos de sensibilidad. Además, se generó una curva patrón representando el logaritmo de las concentraciones del molde de ARN inicial (copias/ μ l) frente al ciclo umbral (Ct) obtenido de cada dilución para determinar el rendimiento global de RT-PCR en tiempo real.

Ensayos de sensibilidad comparativos entre RT-PCR en tiempo real y kit de ensayo Directigen Flu A

Se usaron virus de reserva de dos cepas virales incluyendo A/Wyoming/3/2003 (H3N2) a $10^{6,67}$ EID₅₀/ml (HA=64) y A/canino/Florida/242/2003(H3N8) a $10^{7,17}$ EID₅₀/ml (HA=16) para el ensayo de umbral de detección. Se usaron diluciones logarítmicas de muestras de ensayo en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (125 μ l) en un kit de detección de antígenos de gripe A rápido, Directigen Flu A, (Becton, Dickinson and Company), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada dispositivo de ensayo Directigen Flu A tiene un punto de antígeno de gripe H1N1 en el centro de la membrana que se desarrolla como un punto púrpura e indica la integridad del ensayo, que se basa en un anticuerpo monoclonal para la nucleoproteína (NP). El desarrollo de un triángulo púrpura que rodea al punto es indicativo de la presencia de NP de gripe en la muestra ensayada. La intensidad de la señal púrpura del triángulo se puntuó como + (perfil de triángulo), ++ (triángulo coloreado claro), +++ (triángulo púrpura oscuro) y ++++ (triángulo púrpura muy oscuro). Se extrajo ARN viral en alícuotas de 125 μ l de cada dilución de virus usando Kit de ARN Viral QIAamp Mini (Qiagen, Valencia, CA) y eluyendo en un volumen final de 50 μ l. Se ensayó un volumen de 50 μ l de los ARN virales extraídos por RT-PCR en tiempo real para el ensayo de sensibilidad comparativo con Kit Directigen Flu A.

EJEMPLO 16

55 El ensayo de RT-PCR en tiempo real para gripe canina se basa en información de tres sondas moleculares que se dirigen a ARNr 18S de célula hospedadora así como M y H3 del genoma de virus de la gripe A (Tabla 14). La amplificación del gen hospedador es un indicador de la calidad e integridad de la muestra de ensayo. Se espera que las muestras clínicas, de necropsia o de laboratorio que contienen virus de gripe canina (H3N8) produzcan señal de amplificación con las tres sondas. Las muestras de ensayo que produjeron la señal de amplificación con sondas de ARNr 18S y M pero negativas para H3 serían indicativas de un subtipo H3 de virus de la gripe de origen humano, porcino o aviar o de subtipos no H3. Estos casos poco habituales podrían resolverse por RT-PCR usando cebadores universales de HA para generar ADNc de amplicón que puede analizarse por secuenciación. Las muestras de ensayo recogidas y manipuladas de forma apropiada que carecen de virus de gripe A producen solamente señal de amplificación de ARNr 18S. Las situaciones en las que solamente la sonda de ARNr 18S y las sondas de H3 producen señal de amplificación son indicativas de una técnica defectuosa, a no ser que se pruebe otra cosa. Debe

demostrarse un falso negativo con sondas M o falso positivo para H3. Finalmente, las muestras de ensayo que no producen señales de amplificación con las tres sondas son indicativas de recogida de muestras defectuosas, degradación, extracción de ARN inadecuada o la presencia de inhibidores de las polimerasas usadas en PCR.

- 5 Para ensayar la especificidad del conjunto de sondas/cebador de H3 para virus de gripe canina A (H3N8) y la universalidad del conjunto de cebadores/sonda de M para gripe de tipo A, se ensayaron varios subtipos de virus de gripe A por RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran que el conjunto de cebadores/sonda de H3 produjo una señal de la amplificación positiva solamente con gripe canina (H3N8). No se observaron falsos positivos significativos o señales de amplificación no específicas en otros subtipos o cepas de H3 humana. El conjunto de
10 cebadores/sonda de M produjo señal de amplificación positiva con todas las cepas ensayadas (Tabla 15). Estos resultados indicaron que los cebadores/sonda de H3 detectan específicamente virus de la gripe canina A (H3N8), mientras que los cebadores/sonda de M detectan múltiples subtipos de gripe de tipo A.

- El rendimiento de ensayos de RT-PCR en tiempo real se evaluó por dilución de ARN transcritos *in vitro* de M y H3. Como se esperaba, el ciclo umbral (Ct) aumentó en relación directa con la dilución de los patrones de ARN. Las señales fluorescentes pueden detectarse en diluciones convencionales de ARN de M y H3 tan bajas como 10^3 y 10^2 copias/ μ l, respectivamente (Figura 6A y 6B). Las curvas patrón de genes M y H3 se construyeron representando el logaritmo de las concentraciones de ARN de partida frente al ciclo umbral (Ct) obtenido de cada dilución (Figura 6C y 6D). La pendiente de la curva patrón se usa para determinar la eficacia de reacción de PCR, que es teóricamente exponencial; 100% de eficacia de amplificación implicaría duplicación de la concentración de amplicón en cada ciclo. Las curvas patrón con una pendiente entre aproximadamente -3,1 y -3,6, son típicamente aceptables para la mayoría de las aplicaciones que requieren cuantificación precisa (eficacia de reacción 90-110%). Un valor Rc es el ajuste de todos los datos a la representación de la curva patrón. Si todos los datos quedan perfectamente en la línea, el Rc será 1,00. A medida que los datos quedan más lejos de la línea, el Rc se reduce. Un valor de $Rc \geq 0,985$ es aceptable para la mayoría de los ensayos. La curva patrón de M reveló una pendiente de -3,576 (eficacia = 90,4%) y $Rc = 1,00$ mientras que la curva patrón de H3 produjo una pendiente de -3,423 (eficacia = 95,9%) y $Rc = 0,999$. Estos valores indican eficacia de amplificación satisfactoria y rendimiento global de los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Los inventores atribuyen la menor eficacia y sensibilidad de conjunto de cebadores/sonda de M en comparación con conjunto de cebadores/sonda de H3 a la degeneración N veces de secuencias de cebador de M requeridas para asegurar amplia cobertura de variabilidad de secuencias del gen M entre virus de múltiples subtipos, hospedadores y linajes.
15
20
25
30

- La sensibilidad del ensayo de RT-PCR en tiempo real también se comparó con el ensayo de detección rápida de antígenos comercial (Directigen Flu A). Se analizaron diluciones logarítmicas de A/Wyoming/3/2003 (H3N2) y A/canino/Florida/242/2003(H3N8) con Directigen Flu A y por RT-PCR en tiempo real. Los resultados de Directigen Flu A mostraron que las sensibilidades contra ambas cepas virales son una dilución de aproximadamente 100 veces de los virus de reserva usados en estos experimentos (Figura 7). Las señales (color púrpura) generadas por las muestras de virus canino (A/canino/Florida/242/2003: $10^{6,x}$ UFP/ml) fueron mucho más débiles que las halladas en virus humano (A/Wyoming/3/2003: $10^{7,x}$ UFP/ml), de acuerdo con la menor concentración de virus en estas muestras. Como alternativa, la menor señal para virus de la gripe podría atribuirse a la especificidad molecular de anticuerpos monoclonales contra la NP; es decir, escasa conservación de los aminoácidos dentro del epítipo de NP de virus de gripe canina A.
35
40

- La RT-PCR en tiempo del gen de M produjo valores de Ct por encima del umbral con equivalentes a 10 y 30 UFP de virus por reacción de A/canino/Florida/242/2003 y A/Wyoming/3/2003, respectivamente (Tabla 16). Las diferencias entre el valor de sensibilidad de 2 cepas virales se debe a las diferencias en las titulaciones virales originales. La comparación de detección de genes H3 entre virus de gripe canina y humana no se realizó debido a que los cebadores/sonda de H3 en el ensayo de RT-PCR en tiempo real de los inventores amplifica exclusivamente virus de gripe canina A. La RT-PCR era 10^5 veces más sensible que el kit de detección rápida de antígenos.
45
50

- Para evaluar el rendimiento del ensayo de RT-PCR en muestras de ensayo de necropsia de perros con enfermedad respiratoria aguda, se ensayaron sesenta muestras de tejido de pulmón canino presentadas durante el año 2005 con respecto a la presencia de virus de gripe canina A por RT-PCR en tiempo real. Un total de 12 de 60 muestras (20%) fueron positivas con ambos genes M y H3 mientras que las 48 muestras restantes produjeron resultado negativo para el gen tanto M como H3. Se realizaron intentos de aislamiento de virus por inoculación de células MDCK y huevos, para evaluar la especificidad del ensayo en tiempo real; 2 de 12 muestras que fueron positivas para gripe canina por RT-PCR produjeron virus de gripe canina (datos no mostrados, manuscrito en preparación). Aunque todos los tejidos se recogieron de perros con un historial de enfermedad respiratoria grave, la mayoría de las muestras no produjeron virus de gripe canina por PCR en tiempo real o aislamiento convencional, lo que sugiere una alta incidencia de otros patógenos respiratorios tales como *Bordetella bronchiseptica*, virus del moquillo canino o paragripal. El ensayo de RT-PCR en tiempo real de una etapa en este documento proporciona un enfoque rápido, sensible y rentable para detección de virus de gripe canina A (H3N8). El diagnóstico de laboratorio rápido de infecciones por virus de gripe canina A (H3N8) en la etapa temprana de la enfermedad puede producir información relevante para tratamiento clínico de paciente e instalaciones.
55
60
65

Tabla 13: Cebadores y sondas usados para detección de RT-PCR en tiempo real y transcripción *in vitro*.

Nombre de Oligo	Tipo	Diana	Secuencia	Aplicación
Ca-H3-F387	Cebador directo	H3 (nt 387-406)	5'-tatgcatcgctccgatccat-3' (SEC ID N°: 79)	PCR en tiempo real
Ca-H3-R487	Cebador inverso	H3 (nt 487-467)	5'-gctccacttctccgtttga-3'(SEC ID N°: 80)	
Ca-H3-P430	Sonda TaqMan	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagagggattcacatggacag- BHQ1 (SEC ID N°: 81)	
FluA-M-F151	Cebador Directo	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaagacc-3' (SEC ID N°: 82)	PCR en tiempo real
FluA-M-R276	Cebador inverso	M (nt 276-253)	5'-agggcatttggacaaakcgtcta-3' (SEC ID N°: 83)	
FluA-M-P218	Sonda LNA TaqMan	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgcccAgt-BHQ1 (SEC ID N°: 84)	
H3-F1	Cebador directo	H3 (nt 1-14)	5'-tattcgtctcagggagcaaaagcagggg-3' (SEC ID N°: 85)	Transcripción <i>In vitro</i>
T7/H3-R490	Cebador inverso	T7/H3 (nt 487-467)	5'-tgtaatcagactcactatagggctccacttctccgtttga- 3' (SEC ID N°: 86)	
M-F1	Cebador directo	M (nt 1-15)	5'-gatcgtcttcaggagcaaaagcaggtag-3'(SEC ID N°: 87)	Transcripción <i>In vitro</i>
T7/M-R276	Cebador inverso	M (nt 276-253)	5'-tgtaatcagactcactatagggcatttggacaaagcgtc- 3' (SEC ID N°: 88)	

* Nota: Mayúsculas =restos de LNA (Ácido Nucleico Bloqueado), r = a o g, k= g o t, subrayado= secuencia promotora de T7.

Tabla 14: Interpretación del ensayo de RT-PCR en tiempo real

Interpretación	Resultados		
	M	H3	ARNr 18S
Positivo para virus de gripe canina A (H3N8)	+	+	+
Positivo para virus de gripe A (subtipo desconocido)	+	-	+
Negativo para virus de gripe	-	-	+
Error en extracción de ARN o presencia de inhibidor de PCR	-	-	-

Tabla 15: Ensayo de especificidad de conjunto de cebadores/sonda de H3 canino y ensayo de universalidad de conjunto de cebadores/sonda de M con varios subtipos de virus de gripe A

Subtipos	Nombre de la Cepa	Hospedador	Detección de RT-PCR en tiempo real	
			Gen H3 (Ct)	Gen M (Ct)
H1	A/Ohio/1983	Humano	Sin Ct	15,40
	A/WSN/1933	Humano	Sin Ct	20,09
H3	A/Wyoming/3/2003	Humano	Sin Ct	28,85
	A/Victoria/3/1975	Humano	Sin Ct	16,62
	A/canino/FL/242/2003	Canino	28,43	29,25
H4	Pavo/MN/ 1066/1980	Aviar	Sin Ct	17,49
	Muestra clínica*	Aviar	Sin Ct	20,87
H5	A/Pollo/ Tailandia/CUK2/2004	Aviar	Sin Ct	20,13
	A/Faisán/NJ/ 1335/1998	Aviar	Sin Ct	16,64
H6	Muestra clínica*	Aviar	Sin Ct	19,52
H10	Muestra clínica*	Aviar	Sin Ct	25,64
	Muestra clínica*	Aviar	Sin Ct	19,59
H11	Muestra clínica*	Aviar	Sin Ct	15,72
	Muestra clínica*	Aviar	Sin Ct	24,55

* Obsérvese que los subtipos de muestras clínicas se confirmaron por secuenciación de nucleótidos.

Tabla 16: Ensayos de sensibilidad comparativos para detección de virus de gripe A entre RT-PCR en tiempo real y Directigen Flu A

Diluciones de virus	Directigen Flu A		RT-PCR en tiempo real de M (Ct)	
	A/canino/242/03	A/Wyoming/3/03	A/canino/242/03	A/Wyoming/3/2003
10 ⁻¹	++	++++	22,42	19,48
10 ⁻²	+	+++	25,85	22,66
10 ⁻³	-	-	29,27	25,76
10 ⁻⁴	No realizado	No realizado	32,66	28,66
10 ⁻⁵	No realizado	No realizado	35,48	33,14
10 ⁻⁶	No realizado	No realizado	37,51	35,06
10 ⁻⁷	No realizado	No realizado	39,09	36,44
10 ⁻⁸	No realizado	No realizado	Sin Ct	38,93

Tabla 17

Clase de Aminoácido	Ejemplos de Aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar no cargado	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

Tabla 18

Símbolo de Letra	Aminoácido	Símbolo de Letra	Aminoácido
A	Alanina	M	Metionina
B	Asparagina o ácido aspártico	N	Asparagina
C	Cisteína	P	Prolina
D	Ácido aspártico	Q	Glutamina
E	Ácido glutámico	R	Arginina
F	Fenilalanina	S	Serina
G	Glicina	T	Treonina
H	Histidina	V	Valina
I	Isoleucina	W	Triptófano
K	Lisina	Y	Tirosina
L	Leucina	Z	Glutamina o ácido glutámico

Tabla 19. Diferencias de aminoácidos entre proteínas PB2 de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
5	K	K	E
12	S	L	L
37	G	G	E
175	R	R	I
374	L	I	I
375	R	R	K
447	Q	Q	H

5

Tabla 20. Diferencias de aminoácidos entre proteínas PB1 de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
114	V	I	I
154	D	G	G
221	A	T	T
317	M	I	I
459	I	I	V
682	I	I	V

Tabla 21. Diferencias de aminoácidos entre proteínas PA de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
27	D	N	N
62	I	V	V
213	R	K	K
337	A	T	T
343	A	E	E
345	L	I	I
353	K	R	R

Tabla 21. Diferencias de aminoácidos entre proteínas PA de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
400	T	T	A
450	V	I	I
460	M	M	I
673	R	R	K
675	N	D	D

*Basado en genes disponibles de virus aislados entre 1963 y 1998.

Tabla 22. Diferencias de aminoácidos entre proteínas NP de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
16	G	D	D
157	A	T	T
214	R	R	K
285	V	V	I
286	A	T	T
359	A	T	T
375	D	D	N
384	R	K	K
452	R	K	K

Tabla 23. Diferencias de aminoácidos entre proteínas NA de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
9	A/T	T	A
12	S	F	F
20	L	I	I
40	G	R	R
42	G	D	D
46	N	K	K
52	E	E	K
61	R	K	K
69	N	S	S
72	E	K	K
201	V	I	I
261	I	V	V
301	I	I	V
396	N	D	D
397	L	P	P

Tabla 24. Diferencias de aminoácidos entre proteínas M1 de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
M1 161	S	S	A
M1 208	K/Q	R	R

*Basado en genes disponibles de virus aislados entre 1963 y 1998.

Tabla 25. Diferencias de aminoácidos entre proteínas NS1 de virus de gripe canina y equina H3N8

Posición	Consenso Equino *	Canino/FL/03	Canino/FL/04
44	K	R	R
59	R	H	H
71	E	K	K
86	A	T	T
88	R	R	L
140	R	G	G
216	P	S	S

*Basado en genes disponibles de virus aislados entre 1963 y 1998.

5

EJEMPLO 17 – DESARROLLO DE MODELO DE EXPOSICIÓN A GRIPE CANINA

10

Se observó que el virus de gripe canina (influenza canina) que se aisló de brotes de gripe en Florida era un virus de la gripe de tipo H3N8, y cercanamente relacionado a una cepa de virus de la gripe equina, A/equino/Ohio/03 (Crawford *et al.*, SCIENCE Vol. 309, septiembre de 2005, incorporado por referencia en su totalidad en la presente patente). En este estudio se investigó el potencial de usar el virus de gripe equina cepa A/equino/Ohio/03 para inducir enfermedad de tipo gripal en perros.

Procedimiento:

Se obtuvieron diez beagles de 13 semanas de edad de ambos sexos de un proveedor comercial, y se alojaron en jaulas individuales en una instalación BSL-2. Los perros se asignaron aleatoriamente a dos grupos de 5 perros cada uno. Como se muestra en la Tabla 26, se sometió a un grupo a una exposición intratraqueal, y el otro grupo se sometió a una exposición oronasal. Los perros se expusieron a las 14 semanas de edad.

Grupo	Número de Perros	Vía de exposición
1	5	Intratraqueal
2	5	Oronasal

Se usó un virus de gripe equina A/equino/Ohio/03 crecido en cultivo celular como el virus de exposición. Para exposición intratraqueal, el virus de exposición se administró mediante un tubo de suministro, que consistía en un tubo traqueal con manguito (Tamaño 4,0/4,5, Sheridan, Estados Unidos) y tubo de alimentación (tamaño 5 Fr, 1,7 mm, 40,64 cm de longitud, Kendall, Estados Unidos) en un volumen de 0,5 a 1,0 ml. Para exposición oronasal, el virus de exposición (10^7 a 10^8 DICT50 por perro) se administró como una nebulización usando un nebulizador (nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, Estados Unidos) en un volumen de 2 a 3 ml.

Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con gripe durante 14 días después de la exposición. Se recogieron muestras de suero de cada perro el día cero (antes de la exposición) y los días 7 y 14 después de la exposición para determinar la titulación de HI usando un virus de gripe equina H3N8 con un protocolo convencional (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Todos los perros se sacrificaron de forma humanitaria y se recogieron tejidos pulmonares en formalina tamponada al 10% para evaluación histopatológica.

Resultados:

Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 27. Se observaron señales clínicas relacionadas con la gripe en varios perros después de la exposición. Estas señales incluyeron fiebre (>103 °F; $>39,4^{\circ}$) y tos. Dos de 5 perros (es decir, 40%) tuvieron fiebres (>103 °F; $>39,4^{\circ}$) en el Grupo 1, en comparación con 1 de 5 (es decir, 20%) perros en el Grupo 2. Un perro del grupo de exposición oronasal tuvo estornudos, y otro tuvo tos después de la exposición. Se observó un intervalo de titulación de HI de 10 a 80, con una titulación media geométrica (GMT) de 20 para el Grupo 1. Se observó un intervalo de titulación de 40 a 160, con una GMT de 86, para el Grupo 2. Un perro de cada grupo tuvo lesiones histopatológicas compatibles con o patognómicas para gripe.

Tabla 27. Exposición a gripe canina – señales clínicas, aislamiento del virus, resultados de histopatología y resultados de serología

ID de Perro*	Método de exposición*	Señales Clínicas	Aislamiento de virus			Lesión Microscópica (histopatología)	Serología (titulación de HI)		
			Hisopo nasal/oral	Raspado traqueal	Tejidos pulmonares		Antes de la exposición	7 días después de la exposición	14 días después de la exposición
AAH	Intratraqueal	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo	10	10	20
ADB	Intratraqueal	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	20
ADC	Intratraqueal	Fiebre*	negativo	negativo	negativo	negativo	10	20	20
AEB	Intratraqueal	Fiebre	negativo	negativo	negativo	positivo	10	40	20
AEE	Intratraqueal	ninguna	negativo	negativo	negativo	inconcluyente	10	20	10
AAE	Oronasal	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	80
AAG	Oronasal	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo	10	40	80
ABY	Oronasal	Estornudo ocasional, tos ocasional	negativo	negativo	negativo	positivo	10	80	160
ADY	Oronasal	Fiebre, estornudo ocasional	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	80
ADZ	Oronasal	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	160

* Los animales se expusieron a un aislado de gripe equina Ohio 03.
 ** Temperatura rectal ≥ 103 °F; $\geq 39,4$ °

EJEMPLO 18 – EFICACIA DE UNA VACUNA DE VIRUS DE GRIPE EQUINA PARA PERROS

Se observó que el virus de gripe canina (influenza canina) de brotes de gripe en Florida era un virus de la gripe de tipo H3N8, y estaba cercanamente relacionado con el virus de la gripe equina, A/equino/Ohio/03 basándose en la similitud de la secuencia. El siguiente estudio se realizó para determinar la eficacia de una vacuna de virus de gripe equina inactivado experimental.

Procedimiento:

Se obtuvieron nueve beagles de 7 semanas de edad de ambos sexos de un proveedor comercial, y se alojaron en jaulas individuales en una instalación BSL-2. Estos perros se asignaron aleatoriamente a dos grupos, como se resume en la Tabla 28:

Grupo	Número de Perros	Tratamiento
1	5	Vacuna
2	4	Control

El primer grupo consistía en 5 perros, que se vacunaron con una vacuna de virus de gripe equina A/equino/Ohio/03 con adyuvante CARBIGEN™ a las 8 y 12 semanas de edad por vía subcutánea (SQ). El A/equino/Ohio/03 se inactivó por etilenimina binaria (“BEI”) usando un método convencional. Cada dosis de la vacuna contenía CARBIGEN™ 5% en masa, 4096 unidades de HA del virus inactivado, suficiente PBS para llevar al volumen total de la dosis a 1 ml, y suficiente NaOH para ajustar el pH a un valor comprendido entre 7,2 y 7,4. Se recogieron muestras de suero de todos los perros el día de la primera y segunda vacunación y día 7 y 14, después de la primera y segunda vacunación y antes de la exposición para determinar la titulación de HI usando un protocolo convencional de virus de gripe equina H3N8 (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). A las 3 semanas después de la segunda vacunación, los 5 perros vacunados y el segundo grupo (es decir, el grupo de control) que consistía en 4 perros de edad coincidente se expusieron por vía oronasal a un virus de gripe equina A/equino/Ohio/03 desarrollado en cultivo celular (10⁷ a 10⁸ DICT50 por perro) en un volumen de 1-2 ml por dosis. El virus de exposición se administró a los perros como una nebulización usando un nebulizador (nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise, Medical, Estados Unidos). Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con gripe durante 14 días después de la exposición. Se sacrificaron de forma humanitaria cinco perros (3 vacunados y 2 controles) 7 días después de la exposición y 4 perros (2 controles y 2 vacunados) 14 días después de la exposición para la recogida de tejidos pulmonares en formalina tamponada al 10% para la evaluación histopatológica.

Resultados:

Los resultados de este experimento se resumen en las Tablas 29 y 30. Todos los perros vacunados se seroconvirtieron después de la vacunación. Se observó un intervalo de titulación de HI de 40 a 640, con la GMT de 129, durante el periodo posterior a la vacunación con virus de gripe equina A/equino/Ohio/03 y se observó una titulación de HI de 160 a 320, con una titulación media geométrica de 211 con aislado de gripe canina, A/canino/Florida/242/03. Dos de 6 vacunados tuvieron una fiebre de >39,4 °C (>103 °F) durante un día y no se observaron otras señales clínicas en ninguno de los perros después de la exposición.

Conclusión:

Todos los perros vacunados respondieron a la vacuna de gripe equina con adyuvante CARBIGEN™ inactivada. Los resultados de titulación de HI con un aislado de virus de la gripe canina sugieren que la vacuna de gripe equina inactivada indujo un nivel detectable de anticuerpo con reacción cruzada para virus de gripe canina. Incluso aunque el virus de exposición usado para esto no indujo ninguna enfermedad clínica observable en perros beagles, basándose en la titulación de HI con un aislado de virus de gripe canina, se concluyó que podría usarse la vacuna equina inactivada en perros para inducir anticuerpos de reacción cruzada, que podrían potencialmente proteger a los perros contra la enfermedad “gripe canina” causada por virus de gripe canina de tipo H3N8.

Perro*	Grupo	Titulaciones de HI							
		Pre-vacunación	Después de la 1ª vacunación		Después de la 2ª vacunación			Después de exposición*	
			7-d	14-d	7-d	14-d	21-d	7-d	14-d
AKT	Vacunado**	<10	40	80	640	640	640	320	320
ALH	Vacunado**	<10	40	80	320	160	160	80	***
ALU	Vacunado**	<10	40	80	320	160	160	80	80
ANJ	Vacunado**	<10	40	80	320	160	80	320	***
ANU	Vacunado**	<10	40	80	320	160	80	160	***
AJW	Control	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	***

Perro*	Grupo	Titulaciones de HI							
		Pre-vacunación	Después de la 1ª vacunación		Después de la 2ª vacunación			Después de exposición*	
			7-d	14-d	7-d	14-d	21-d	7-d	14-d
AKR	Control	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	10	***
ALZ	Control	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	20	20
ARC	Control	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	10	10

* Los animales se expusieron a un aislado de gripe equina Ohio 03
 ** Se usó vacuna de virus de gripe equina inactivado con adyuvante CARBIGEN™ Ohio 03 para la vacunación
 *** Sacrificado 7 días después de la exposición.

ID de Perro*	Grupo de tratamiento	Señales Clínicas	Aislamiento de virus			Lesión Microscópica (histopatología)
			Hisopo nasal	Raspado traqueal	Tejidos pulmonares	
AKT	Vacunado**	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
ALH	Vacunado**	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
ALU	Vacunado**	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
ANJ	Vacunado**	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
ANU	Vacunado**	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
AJW	Control	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
AKR	Control	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
ALZ	Control	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo
ARC	Control	ninguna	negativo	negativo	negativo	negativo

* Los animales se expusieron a un aislado de gripe equina Ohio 03
 ** Se usó vacuna de virus de gripe equina Ohio 03 inactivado con adyuvante CARBIGEN™ para la vacunación

EJEMPLO 19 – EFICACIA DE UNA VACUNA DE VIRUS DE GRIPE EQUINA PARA PERROS

- 5 El virus de gripe equina aislado de brotes de gripe en Florida se caracterizó como cercanamente relacionado con varios aislados de virus de gripe equina de tipo H3N8. Mediante análisis de similitud de secuencia de aminoácidos y ADN se demostró que el virus de gripe canina es muy similar a un virus de gripe equina, A/equino/Ohio/03. El siguiente estudio se realizó en perros para determinar la eficacia de vacunas de gripe equina disponibles en el mercado en perros.

10

Procedimiento:

Se usaron 20 mestizos y 20 beagles de aproximadamente 16 meses de edad de ambos sexos en el estudio. Los perros se asignaron aleatoriamente a 6 grupos (Tabla 31) de 6-7 perros cada uno. Los perros en los grupos 1 y 4 se vacunaron con una vacuna de gripe equina con adyuvante inactivada disponible en el mercado (EQUICINE II™, Intervet Inc., Millsboro, DE) a los 16 y 17 meses de edad por vía subcutánea (SQ). Los perros de los grupos 2 y 5 se vacunaron con una vacuna de gripe equino/Kentucky/91 viva modificada en un volumen de 1 ml por vía intranasal (un orificio nasal). Se recogieron muestras sanguíneas el día de la vacunación, día 7 y 14 después de la primera vacunación (grupos 1, 2, 4 y 5) y después de la segunda vacunación (grupos 1 y 4) para determinar la titulación de HI usando un virus de gripe equina H3N8 y un virus de gripe canina usando un protocolo convencional (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA).

Los vacunados (a los 72 días después de la vacunación final) y los controles se expusieron por vía oronasal a una cepa de virus de gripe equina A/equino/Ohio/03 desarrollada en cultivo celular (10^7 a 10^8 DICT50 por perro) en un volumen de 1-2 ml. El virus de exposición se administró a los perros como una nebulización usando un nebulizador (nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, Estados Unidos). Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con la gripe durante 12 días después de la exposición. Los hisopos nasales y orofaríngeos se recogieron en medio MEM de Earl con antibióticos (neomicina y polimixina B) diariamente del día - 1 al día 12 después de la exposición para el aislamiento de virus. La presencia de virus en los hisopos indica que el animal excreta el virus en secreciones nasales/orales. Todos los perros se sacrificaron de forma humanitaria el día 12 después de la exposición y se recogieron tejidos pulmonares en formalina tamponada al 10% para la evaluación histopatológica.

30

Tabla 31. Diseño experimental.

Grupo	Número de perros	Raza	Tratamiento	Número de dosis	Vía de vacunación
1	7	Beagle	EQUICINE II™ **	2	Subcutánea
2	7	Beagle	A/KY/91***	1	Intranasal
3	6	Beagle	Control	N/A*	N/A*
4	7	Mestiza	EQUICINE II™	2	Subcutánea
5	7	Mestiza	A/KY/91	1	Intranasal
6	6	Mestiza	Control	N/A*	N/A*

* No aplicable
 ** EQUICINE II™ se comercializa por Intervet Inc. como una vacuna líquida. EQUICINE II™ contiene virus de la gripe A/Pensilvania/63 inactivado (o "A/Pa/63") y virus de gripe A/equino/Kentucky/93 (o "A/KY/93") con carbopol (es decir, HALOGEN® (Intervet Inc.)). Más específicamente, una dosis de EQUICINE II™ contiene: A/Pa/63 inactivado a 10^{6,0} EID₅₀, A/KY/93 inactivado a 10^{6,7} EID₅₀, carbopol 0,25% en volumen y suficiente PBS para crear un volumen total de 1 ml.
 *** A/KY/91 es una vacuna liofilizada que se reconstituyó con agua. Dicha reconstitución se realizó usando agua de uso en vacunas suficiente para llevar la dosificación de vacuna a un volumen total de 1 ml. La vacuna contenía virus de gripe equino/Kentucky/91 o ("A/KY/91"), y se analiza en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.436.408; 6.398.774; y 6.177.082, que se incorporan por referencia en su totalidad en la presente patente. Cuando se reconstituye, una dosis de la vacuna contenía A/KY/91 a 10^{7,2} DICT₅₀ por ml, 0,015 gramos de N-Z AMINE AS™ por ml, 0,0025 gramos de gelatina por ml y 0,04 gramos de D lactosa por ml. N-Z AMINE AS™ es una fuente refinada de aminoácidos y péptidos producidos por hidrólisis enzimática de caseína. N-Z AMINE AS™ se comercializa por Kerry Bio-Science (Norwich, NY, Estados Unidos).

Resultados:

- 5 Todos los perros vacunados se seroconvirtieron después de la vacunación y las titulaciones de HI variaron de 10 a 80 para perros del grupo de vacuna EQUICINE II™ en comparación con 10 a 40 para los perros del grupo de vacuna A/KY/91 usando un virus de gripe equina (tipo H3N8).
- 10 Las muestras recogidas a las 2 semanas después de la vacunación (después de la segunda vacunación para vacuna EQUICINE II™) se analizaron para la determinación de la titulación de HI con una gripe canina así como con un virus de gripe equina (tipo H3N8). Los resultados de HI se muestran en la Tabla 32. Las señales clínicas incluyen fiebre (>103 °F, >39,4 °C), tos ocasional y descarga nasal leve observada después de la exposición.

Tabla 32. Serología – Titulaciones de HI a las 2 semanas después de la vacunación

Grupo	Número de perros	Raza	Tratamiento	Titulación de HI con			
				Virus de gripe equina		Virus de gripe canina	
				Intervalo	GMT	Intervalo	GMT
1	7	Beagle	Equicine II™	10-80	36	10-80	33
2	7	Beagle	A/KY/91	10-20	12	20-160	54
3	6	Beagle	Control	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
4	7	Mestiza	Equicine II™	40-80	54	40-80	50
5	7	Mestiza	A/KY/91	10-40	24	40-80	49
6	6	Mestiza	Control	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

* No aplicable

- 15 Entre los beagles, 2 de 6 perros en el grupo de vacuna EQUICINE II™ (Grupo 1), 1 de 7 perros en el grupo de vacuna A/KY/91 (Grupo 2) y 2 de 6 perros en el grupo de control (Grupo 3) tuvieron fiebre. Uno de 6 perros en el Grupo 3 (control) fue positivo para virus en el sobrenadante de cultivo celular de material de hisopo nasal por ensayo de hemaglutinación con glóbulos rojos de pollo 0,25% (CRBC). Uno de 6 perros en el grupo de control (Grupo 3) y 1 de 7 perros en el grupo de vacuna A/KY/91 (Grupo 2) tuvo descarga nasal leve durante el periodo de observación posterior a la exposición. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre grupos de control y vacuna para perros beagles.

- 25 Entre los mestizos, 5 de 7 perros en el grupo de vacuna EQUICINE II™ (Grupo 4), 1 de 7 perros en el grupo de vacuna A/KY/91 (Grupo 5) y 5 de 6 perros en el grupo de control (Grupo 6) tuvieron fiebre. Un perro de cada uno del Grupo 4 y 6 tuvo una descarga nasal leve, y un perro del Grupo 5 tuvo una tos ocasional. Dos de 7 perros en el grupo de vacuna EQUICINE II™ (Grupo 4) y 3 de 6 perros en el grupo de control (Grupo 6) fueron positivos para virus de la gripe en el hisopo nasal por ensayo de HA. Ninguno de los perros del grupo A/KY/91 (Grupo 5) fue positivo para virus de la gripe en los materiales de hisopo nasal.

30

Conclusión:

Por serología, se demostró que la vacunación de perros con vacunas de gripe equina disponibles en el mercado estimuló una respuesta de anticuerpos contra la gripe de nivel moderado. Puede haber algunas diferencias entre razas en el desarrollo de señales clínicas relacionadas con gripe en perros después de una exposición a virus de la gripe de tipo H3N8. La vacuna de gripe equina atenuada viva (A/KY/91) proporcionó una protección significativa ($P < 0,05$) de desarrollo de enfermedad clínica en temperatura rectal en mestizos. Además, la vacuna viral atenuada viva evitó la supresión de virus de la gripe en las secreciones nasales.

10 EJEMPLO 20 – DESARROLLO DE MODELO DE EXPOSICIÓN A GRIPE CANINA

En vista de los informes de que la inducción de enfermedad en cánidos para fines de estudio no ha demostrado ser satisfactoria, se investigó el potencial para usar un virus de LA gripe canina, H3N8, para desarrollar un modelo de exposición a gripe canina en perros en el siguiente estudio.

15 Procedimiento:

Se obtuvieron diez mestizos de ambos sexos de un proveedor comercial, y se alojaron en jaulas en una instalación BSL-2. Los perros se asignaron aleatoriamente a dos grupos de 5 perros cada uno. Como se muestra en la Tabla 33, un grupo se sometió a una exposición intratraqueal/intranasal y el otro grupo se sometió.

Grupo	Número de Perros	Vía de exposición
1	5	Intratraqueal/Intranasal
2	5	Oronasal

Los perros se expusieron aproximadamente a las 12 semanas de edad. Se usó virus de gripe canina (A/canino/Florida/242/03) desarrollado en huevo de pollo embrionado como virus de exposición. Cada perro recibió un total de aproximadamente $10^{7,2}$ DICT₅₀ de virus en un volumen de 2 ml (para vía oronasal) o 4 ml (vía intratraqueal/intranasal).

Para la exposición intratraqueal/intranasal, en primer lugar se administraron 3 ml del virus de exposición a la tráquea, seguidos de 5 ml de PBS usando un tubo de suministro, que consistía en un tubo traqueal con manguito (Tamaño 4,5/5,0, Sheridan, Estados Unidos) y un tubo de alimentación (tamaño 5 Fr, 1,7 mm; 41 cm (16 pulgadas) de longitud, Kendall, Estados Unidos) y se administró 1 ml de virus de exposición, seguido de 3 ml de aire atmosférico en los orificios nasales usando una jeringa.

Para exposición oronasal, el virus de exposición se administró como una nebulización usando un nebulizador (Nebulair™, DVM Pharmaceuticals, Inc., Miami, FL) en un volumen de aproximadamente 2 ml. Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con la gripe durante 14 días después de la exposición. Los perros se sacrificaron el día 14 después de la exposición y se recogieron muestras tisulares (pulmón y tráquea) en formalina tamponada al 10% para el examen histopatológico.

40 Resultados:

Todos los perros en los grupos 1 y 2 desarrollaron señales clínicas de gripe canina en un periodo de 24 a 48 horas. Cada perro tuvo 2 o más de las siguientes señales: fiebre ($>103,0$ °F; $>39,4$ °C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, náuseas, hemoptisis y estertores audibles. Los tejidos pulmonares de 5 de 5 perros del grupo 1 y 4 de 5 perros del grupo 2 tuvieron lesiones histopatológicas que incluían uno o más de los siguientes: bronconeumonía supurante difusa, bronquitis/bronquiolitis con tapones de exudado neutrófilo en los lúmenes y agregación de células mononucleares notable en mucosa y tejido peribronquiolar, exudado mixto dentro de alvéolos con grandes números de macrófagos espumosos, infiltración linfocítica y plasmacítica, así como de células granulocíticas y engrosamiento de septos alveolares con proliferación de neumocitos de tipo II compatibles con o patogénicos para una infección de virus de la gripe. Las muestras del tejido de la tráquea fueron normales.

Conclusión:

Puede usarse un aislado de gripe canina H3N8 tal como el usado en el presente estudio para inducir enfermedad de gripe canina en perros usando uno de los métodos descritos en el presente estudio o un método similar.

EJEMPLO 21 – DESARROLLO DE MODELO DE EXPOSICIÓN A GRIPE CANINA

En el siguiente estudio se investigó adicionalmente el potencial para usar un virus de gripe canina, H3N8, para desarrollar un modelo de exposición a gripe canina en perros.

Procedimiento:

Se obtuvieron quince mestizos de 17 a 18 semanas de edad y cinco beagles de 15 semanas de edad de proveedores comerciales, y se alojaron en jaulas en una instalación BSL-2. Los mestizos se asignaron de forma aleatoria a 3 grupos (Grupos 1 a 3) de 5 perros cada uno. Todos los beagles se asignaron a un grupo (Grupo 4) como se muestra en la Tabla 34.

Grupo	Raza	Número de Perros	Dosis de virus de exposición
1	Mestizos	5	10 ^{6,8} DICT ₅₀
2	Mestizos	5	10 ^{5,8} DICT ₅₀
3	Mestizos	5	10 ^{4,8} DICT ₅₀
4	Beagles	5	10 ^{6,8} DICT ₅₀

Los perros se expusieron por vía oronasal a un virus de gripe canina virulento, A/Canino/Florida/242/2003 (aislado de pulmón de un galgo con enfermedad de gripe canina (proporcionado por la Dr. Cynda Crawford en la Universidad de Florida)). El virus de exposición se administró como una nebulización usando un nebulizador (Nebulair™) en un volumen de aproximadamente 2 ml. Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con gripe durante 14 días después de la exposición.

Resultados:

El ochenta por ciento (4 de 5) de los perros en los Grupos 1 y 4, 100% de los perros en los Grupos 2 y 3, desarrollaron señales clínicas de gripe canina en un periodo de 48 horas. Cada perro tuvo una o más de las siguientes señales clínicas: fiebre (>103,0 °F; >39,4 °C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, náuseas y estertores. Las señales clínicas observadas en beagles fueron generalmente más leves y de ciclo corto en comparación con los mestizos.

Conclusión:

Puede usarse un aislado de gripe canina H3N8 tal como el usado en el presente estudio para inducir enfermedad de tipo gripe canina o de tipo tos de las perreras en perros usando el método descrito en el presente estudio o un método similar con un intervalo de dosis de exposición de 10^{4,8} a 10^{6,8} DICT₅₀. Hubo algunas diferencias en las señales clínicas observadas en mestizos y beagles. En general, los beagles tienden a tener señales clínicas relacionadas con gripe más leves en comparación con mestizos.

EJEMPLO 22 – ESTUDIO DE EFICACIA DE VACUNA DE GRIPE CANINA

El siguiente estudio se realizó para evaluar la eficacia de una vacuna de gripe equina H3N8 en perros frente a virus de gripe canina.

Procedimiento:

Se obtuvieron diecisiete mestizos de 14 semanas de edad y diez beagles de 8 semanas de edad de proveedores comerciales. Los perros se asignaron aleatoriamente a 5 grupos como se muestra en la Tabla 35 y se alojaron en una instalación de investigación.

Grupo	Edad	Número de perros	Tratamiento	Número de dosis	Edad de vacunación (semanas)
1	14 semanas	7	Vacunado	2	14 y 18
2	14 semanas	5	Vacunado	1	18
3	14 semanas	5	Control	--	--
4	8 semanas	5	Vacunado	2	8 y 12
5	8 semanas	5	Control	--	--

La vacuna usada en el presente estudio fue una vacuna de virus de gripe equina (A/equino/KY/02) inactivado con adyuvante HAVLOGEN®. Para preparar esta vacuna, el virus se inactivó por etilenimina binaria (BEI) usando un método convencional. Cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 6144 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal 10%, 0,1% (v/v) de rojo de fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2 y suficiente PBS para llevar el volumen de dosis total a 1 ml.

Los perros en los Grupos 1 y 4 se vacunaron con 2 dosis de la vacuna. La segunda dosis (es decir, el refuerzo) se administró 4 semanas después de la primera. Los perros en el Grupo 2 se vacunaron con 1 dosis a las 18 semanas de edad. Se recogieron muestras de sangre para evaluar la titulación de HI usando un protocolo convencional (por ejemplo, SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA) con un aislado de gripe canina H3N8 los días cero (antes de la

vacunación), 7 y 14 después de la primera y segunda vacunaciones. Aproximadamente 5 días antes de la exposición, los perros se mudaron a una instalación BSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

5 Todos los perros vacunados y de control de edad coincidente se expusieron por vía oronasal a un virus de gripe canina virulento ($10^{7.7}$ DICT50 de A/Canino/Florida/242/2003 por perro) a las 2 semanas después de la segunda
 10 vacunación de los Grupos 1 y 4 y la primera vacunación del Grupo 2. El virus de exposición se administró como una nebulización usando un nebulizador (Nebulair™) a 2 ml por perro. Los perros se observaron con respecto a las señales clínicas relacionadas con gripe durante 17 días después de la exposición. Se recogieron hisopos nasales y orofaríngeos en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte de virus para aislamiento de virus desde el día -1
 15 (es decir, un día antes de la exposición) a 17 días después de la exposición. Todos los perros se sacrificaron el día 17 después de la exposición y se recogieron muestras de pulmón y traqueales en formalina tamponada al 10% para histopatología. Se recogieron muestras sanguíneas los días 7 y 14 después de la exposición para determinación de titulación de HI. Las asignaciones de puntuación de señales clínicas usadas para la observación posterior a exposición se muestran en la Tabla 36.

Resultados:

20 Todos los perros en los grupos de vacunación de 2 dosis (Grupo 1 y 4) desarrollaron respuestas de titulación de anticuerpo de HI al aislado de virus de gripe canina (Tabla 37). Después de la exposición, un aumento de aproximadamente 4 veces en la titulación el día 14 después de la exposición en todos los grupos indicó indirectamente en todos los grupos que todos los perros se habían expuesto al virus de exposición. Todos los perros mostraron una o más de las siguientes señales de gripe canina: fiebre ($>103,0$ °F; $>39,4$ °C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso y disnea. Las vacunas tuvieron señales clínicas menos graves, en comparación con controles de edad coincidente
 25 (Tabla 38). Hubo una reducción significativa de las señales clínicas debido a la vacunación de 2 dosis en perros tanto de 8 semanas de edad ($P = 0,040$) como de 14 semanas de edad ($P = 0,003$) (Grupos 4 y 1 respectivamente). En este experimento, la vacunación de una dosis no proporcionó una reducción significativa ($P = 0,294$) en señales clínicas (Grupo 2).

30 Se muestran resultados de aislamiento de virus en la Tabla 39. Entre los perros de 14 semanas de edad, se aisló virus de gripe canina de muestras de hisopo recogidas de 2 de 7 perros (29%) del grupo de vacuna de 2 dosis (Grupo 1), 3 de 5 perros (60%) del grupo de vacuna de 1 dosis (Grupo 2) y 5 de 5 perros (100%) del grupo de control (Grupo 3). Entre perros de 8 semanas de edad, el virus se aisló de 1 de 5 perros (20%) del grupo de vacuna de 2 dosis (Grupo 4) y 4 de 5 perros (80%) del grupo de control (Grupo 5). Hubo una reducción significativa ($P = 0,003$) en el número de perros positivos para virus de gripe canina en muestras de hisopo debida a la vacunación de 2 dosis (Grupos 1 y 4) en comparación con los controles no vacunados (Grupos 3 y 5). Aunque hubo una reducción en el número de perros (60% frente a 100%) positivos para virus de gripe canina en muestras de hisopo entre el grupo de vacuna de 1 dosis (Grupo 2) y el grupo de control (Grupo 3), la diferencia no fue estadísticamente
 35 significativa ($P = 0,222$).

40 Se realizó una evaluación histopatológica de muestras tisulares de pulmón y traqueales con respecto a lesiones para identificar lesiones compatibles con o patognómicas para la enfermedad de gripe canina. Esto incluye, por ejemplo, determinación de si existen uno o más de los siguientes: áreas con bronconeumonía supurante; peribronquitis/peribronquiolitis con agregación de células mononucleares (linfocitos, células plasmáticas); presencia
 45 de tapones de residuos celulares granulocíticos en los lúmenes; hiperplasia de epitelio respiratorio; exudado mixto en los alvéolos con gran cantidad de células granulocíticas y residuos celulares; agregados de macrófagos (espumosos), células plasmáticas y linfocitos; y engrosamiento de septos alveolares con proliferación de neumocitos de tipo II.

50 La Tabla 40 proporciona un resumen del alcance de las lesiones en este experimento para los perros. Entre perros de 14 semanas de edad, las lesiones pulmonares fueron menos extensas y menos graves en 5 de 7 perros en el grupo de vacunación de 2 dosis (grupo 2) y 4 de 5 perros en el grupo de vacunación de una dosis (grupo 1). Todos los perros de control (grupo 3) tuvieron lesiones graves y extensas que sugieren ausencia de protección. No hubo diferencia en las lesiones traqueales debido a vacunación de 1 o 2 dosis entre perros de 14 semanas de edad. Entre
 55 perros de 8 semanas de edad, no hubo diferencia en lesiones pulmonares entre perros vacunados con 2 dosis y de control. Ninguno de los perros tuvo ninguna lesión traqueal.

Conclusión:

60 Los resultados de este estudio demuestran que: (1) el virus de gripe equina H3N8 inactivado puede inducir respuestas de anticuerpo HI reactivo de forma cruzada con virus de gripe canina en perros vacunados, (2) el uso de una vacuna de virus de gripe equina H3N8 puede reducir la gravedad de la enfermedad por virus de gripe canina en perros y (3) el uso de una vacuna de virus de gripe equina H3N8 puede reducir la excreción de virus en secreciones nasales y/u orales.

65

Tabla 36. Señales clínicas y sistema de puntuación

Señales clínicas	Puntuación por día
Temperatura	
<103,0 °F(<39,4 °C)	0
103,0-103,9 °F (39,4-39,94 °C)	2
104,0-104,9 °F(40,0-40,5 °C)	3
>105,0 °F(>40,6 °C)	4
Tos	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxístico	4
Estornudos	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxístico	2
Descarga nasal	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Descarga ocular	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Hemoptisis	
No	0
Sí	5
Depresión	
No	0
Sí	1
Anorexia	
No	0
Sí	1
Señales respiratorias	
Ninguna	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeo	5
Expectorado mucoso	
No	0
Sí	2
Vómitos	
No	0
Sí	1
Anomalías fecales	
No	0
Sí	1

Tabla 37. Serología – Titulaciones de Inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Edad (semanas)	Tratamiento	Número de dosis	Titulación de HI							
					Días después de la primera vacunación de los grupos 1 y 4						Días después de exposición	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	921	14	Vacunado	2	<10	<10	10	20	40	20	160	320
1	926	14	Vacunado	2	<10	<10	<10	40	40	80	80	>640
1	931	14	Vacunado	2	<10	<10	<10	10	20	20	80	>640
1	955	14	Vacunado	2	<10	<10	<10	10	40	40	160	320

Tabla 37. Serología – Titulaciones de Inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Edad (semanas)	Tratamiento	Número de dosis	Titulación de HI							
					Días después de la primera vacunación de los grupos 1 y 4						Días después de exposición	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	011	14	Vacunado	2	<10	<10	<10	10	20	40	160	320
1	013	14	Vacunado	2	<10	<10	<10	20	40	40	160	320
1	019	14	Vacunado	2	<10	<10	<10	10	20	40	80	>640
2	922	14	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>640	>640
2	953	14	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>40
2	015	14	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>640
2	016	14	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	320
2	017	14	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>640
3	923	14	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160
3	012	14	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320
3	014	14	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160
3	018	14	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160
3	01A	14	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160
4	406	8	Vacunado	2	<10	<10	10	40	80	80	160	>640
4	407	8	Vacunado	2	<10	20	20	40	40	40	320	>640
4	504	8	Vacunado	2	<10	<10	10	20	20	80	160	>640
4	704	8	Vacunado	2	<10	<10	10	40	80	160	160	>640
4	705	8	Vacunado	2	<10	<10	<10	40	80	160	160	>640
5	404	8	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
5	405	8	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
5	610	8	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	40
5	702	8	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
5	703	8	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160

*Primera vacunación - Grupos 1 y 4
 ** Segunda vacunación - Grupos 1 y 4; Primera vacunación - Grupo 2
 ***Día de exposición

Tabla 38. Análisis de puntuaciones clínicas de enfermedad de gripe canina total

Grupo	Tratamiento	Número de dosis de vacuna	Edad en la primera vacunación de los grupos 1 y 4	Puntuación media total por perro	P-valor*
1	Vacunado	2	14 semanas	8,7	0,003 (Grupo 1 frente a 3)
2	Vacunado	1	14 semanas (estos perros se vacunaron una vez, cuando tenían 18 semanas de edad)	21,8	0,294 (Grupo 2 frente a 3)
3	Control		14 semanas (estos perros no estaban vacunados)	25,4	
4	Vacunado	2	8 semanas	2,0	0,040 (Grupo 4 frente a 5)
5	Control		8 semanas (estos perros no estaban vacunados)	5,4	

*Analizado usando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 8.2 (los grupos de vacuna se compararon usando el ensayo de suma de rangos Wilcoxon)

Tabla 39. Difusión viral

Nº Grupo	ID de perro	Edad (semanas)	Tratamiento	Número de dosis de vacuna	Días después de la exposición																				
					-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
5	404	8	Control	N/A	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
5	405	8	Control	N/A	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	610	8	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	702	8	Control	N/A	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	703	8	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Tabla 40. Evaluación histopatológica de muestras tisulares

Nº Grupo	ID de perro	Edad (semanas)	Tratamiento	Número de dosis	Lesión Microscópica (Histopatología)	
					Pulmones	Tráquea
1	921	14	Vacunado	2	+/-	-
1	926	14	Vacunado	2	-	+/-
1	931	14	Vacunado	2	-	-
1	955	14	Vacunado	2	+/-	-
1	011	14	Vacunado	2	+/-	-
1	013	14	Vacunado	2	+/-	+/-
1	019	14	Vacunado	2	+/-	+/-
2	922	14	Vacunado	1	+/-	-
2	953	14	Vacunado	1	+/-	+/-
2	015	14	Vacunado	1	+/-	+
2	016	14	Vacunado	1	-	-
2	017	14	Vacunado	1	+/-	+/-
3	923	14	Control	N/A	+	+/-
3	012	14	Control	N/A	+	-
3	014	14	Control	N/A	+	-
3	018	14	Control	N/A	+	-
3	01A	14	Control	N/A	+	+/-
4	406	8	Vacunado	2	+/-	-
4	407	8	Vacunado	2	-	-
4	504	8	Vacunado	2	+/-	-
4	704	8	Vacunado	2	-	-
4	705	8	Vacunado	2	-	-
5	404	8	Control	N/A	-	-
5	405	8	Control	N/A	-	-
5	610	8	Control	N/A	+/-	-
5	702	8	Control	N/A	+/-	-
5	703	8	Control	N/A	-	-

“+” Lesión grave coherente o patognómica para una infección de gripe
 “+/-” Lesión suave (no concluyente)
 “-” Normal

EJEMPLO 23 – ESTUDIO DE EFICACIA DE VACUNA DE GRIPE CANINA

5 Se realizó el siguiente estudio para determinar la eficacia de una vacuna de gripe equina H3N8 multivalente contra virus de gripe canina en perros.

Procedimiento:

10 Se obtuvieron diecisiete beagles de 15 semanas de edad de un proveedor comercial. Los perros se asignaron aleatoriamente a 3 grupos como se muestra en la tabla 41, y se alojaron en una instalación de investigación.

Tabla 41. Diseño experimental

<u>Grupo</u>	<u>Número de perros</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Número de dosis</u>	<u>Edad en la vacunación (semanas)</u>
1	7	Vacunado	2	15 y 19
2	5	Vacunado	1	19
3	5	Control	-	--

15 La vacuna usada en este estudio fue una vacuna de gripe equina (A/equino/KY/ 02, A/equino/KY/93 y A/equino/NM/2/93) inactivada con adyuvante HAVLOGEN®. Para preparar esta vacuna, los virus se inactivaron por etilenimina binaria (BEI) usando un método convencional. Cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 2048 unidades de HA de cada uno de los virus inactivados, 0,1% (v/v) de timerosal 10%, 0,1 % (v/v) de rojo de fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para llevar el volumen de dosis total a 1 ml.

20 Los perros en el grupo 1 se vacunaron con 2 dosis de la vacuna. La segunda dosis (es decir, refuerzo) se administró 4 semanas después de la primera dosis. Los perros en el grupo 2 se vacunaron con una dosis de vacuna a las 19 semanas de edad. Se recogieron muestras sanguíneas para evaluar la titulación de HI usando un protocolo convencional con un aislado de gripe canina H3N8 los días cero (antes de la vacunación), 7 y 14 después de la primera y segunda vacunaciones. Siete días antes de la exposición, los perros se movieron a una instalación BSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

25 Todos los perros vacunados y de control con edad coincidente se expusieron por vía oronasal a un virus de gripe canina virulento ($10^{7.3}$ DICT50 de A/canino/Florida/242/2003 por perro) a las 2 semanas después de la segunda

ES 2 393 406 T3

vacunación del grupo 1 y primera vacunación del grupo 2. El virus de exposición se administró como una nebulización usando un nebulizador (Nebulair™) a 2 ml por perro. Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con gripe durante 14 días después de la exposición. Todos los perros se sacrificaron el día 14 después de la exposición, y se recogieron muestras de pulmón y tráquea en formalina tamponada al 10% para histopatología. Se recogieron muestras sanguíneas los días 7 y 14 después de la exposición para determinación de titulación de HI. Las asignaciones de puntuaciones de señal clínica usadas para la observación después de la exposición se muestran en la Tabla 42.

Resultados:

Todos los perros vacunados desarrollaron respuestas de titulación de anticuerpo HI al aislado de virus de gripe canina (Tabla 43). Después de la exposición, un aumento de aproximadamente 4 veces de la titulación de HI el día 14 después de la exposición en comparación con la titulación de HI antes de la exposición en todos los grupos indica indirectamente que todos los perros se expusieron al virus de exposición. Todos los perros mostraron señales de enfermedad de gripe canina demostrando cada perro una o más de las siguientes señales clínicas: fiebre (>103,0 °F; >39,4 °C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso y disnea. Las vacunas tuvieron señales clínicas menos graves, en comparación con controles de edad coincidente (Tabla 44). Hubo una reducción significativa (P = 0,028) en las señales clínicas debido a la vacunación de 2 dosis en perros (grupo 1). La vacunación de una dosis no proporcionó una reducción significativa (P = 0,068) en señales clínicas (grupo 2).

Como en el Ejemplo 22, se realizó evaluación histopatológica de muestras tisulares de pulmón y traqueales con respecto a lesiones para identificar lesiones compatibles con o patognomónicas para enfermedad de gripe canina. La Tabla 45 proporciona un sumario del alcance de las lesiones en este experimento para los perros. Entre perros de 15 semanas de edad, la vacunación de perros con 1 dosis o 2 dosis evitó las lesiones pulmonares en todos los perros. Cuatro de 5 perros de control (80%) tuvieron bronconeumonía supurante grave coherente con una enfermedad gripal. Uno de 7 perros del grupo de vacuna de 2 dosis (grupo 1) y 1 de 5 perros del grupo de control (grupo 3) tuvieron lesiones de tráquea leves que sugieren traqueítis que podría atribuirse a enfermedad gripal.

Conclusión:

Los resultados de este estudio demuestran que 1) el virus de gripe equina H3N8 inactivado puede inducir respuestas de anticuerpo de HI reactivo de forma cruzada con virus de gripe canina en perros vacunados, y 2) el uso de una vacuna de virus de gripe equina H3N8 puede reducir la gravedad de la enfermedad del virus de la gripe canina en perros.

Tabla 42. Señales clínicas y sistema de puntuación	
Señales clínicas	Puntuación por día
Temperatura	
<103,0 °F (<39,4 °C)	0
103,0 -103,9 °F (39,4-39,94 °C)	2
104,0-104,9 °F (40,0-40,50 °C)	3
>105,0 °F(>40,6 °C)	4
Tos	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxística	4
Estornudos	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
Descarga nasal	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Descarga ocular	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Hemoptisis	
No	0
Sí	5

ES 2 393 406 T3

Tabla 42. Señales clínicas y sistema de puntuación	
Señales clínicas	Puntuación por día
Depresión	
No	0
Sí	1
Anorexia	
No	0
Sí	1
Señales respiratorias	
Ninguna	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
Expectorado mucoso	
No	0
Sí	2
Vómitos	
No	0
Sí	1
Anomalías fecales	
No	0
Sí	1

Tabla 43. Serología - titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Número de dosis	Titulación de HI							
				Días después de la primera vacunación de Grupo 1						Días después de la exposición	
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	ALK	Vacunado	2	<10	<10	20	20	80	40	160	320
1	AMF	Vacunado	2	<10	<10	10	20	20	40	160	320
1	AKY	Vacunado	2	<10	20	20	20	40	40	160	80
1	ALC	Vacunado	2	<10	10	10	10	40	40	160	160
1	ALL	Vacunado	2	<10	<10	10	10	40	20	160	320
1	ALM	Vacunado	2	<10	<10	10	20	40	40	80	160
1	AMU	Vacunado	2	<10	20	40	40	40	40	40	160
2	ALA	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	320	160
2	AMA	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	20	>640	80
2	APD	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	>640	320
2	APG	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	320	80
2	APT	Vacunado	1	<10	<10	<10	<10	<10	10	320	320
3	ALT	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160
3	AMS	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
3	AKX	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	80
3	ALX	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
3	AMI	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	80

* Primera vacunación - Grupo 1
 ** Segunda vacunación - Grupo 1; Primera vacunación - Grupo 2
 *** Día de exposición

ES 2 393 406 T3

Tabla 44. Análisis de puntuaciones clínicas de enfermedad de gripe canina total

Grupo	Tratamiento	Número de dosis	Edad a la primera vacunación de Grupo 1	Puntuación media total por perro	P-valor*
1	Vacunado	2	15 semanas	6,3	0,028 (Grupo 1 frente a 3)
2	Vacunado	1	15 semanas (estos perros se vacunaron una vez, cuando tenían 19 semanas de edad)	14,2	0,068 (Grupo 2 frente a 3)
3	Control	--	15 semanas (estos perros no se vacunaron)	24,4	--

* Analizado usando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 8,2 (los grupos de vacuna se compararon usando el ensayo de suma de rangos Wilcoxon)

Tabla 45. Evaluación histopatológica de muestras tisulares

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Número de dosis	Lesión microscópica (Histopatología)	
				Pulmón	Tráquea
1	ALK	Vacunado	2	-	+/-
1	AMF	Vacunado	2	-	-
1	AKY	Vacunado	2	-	-
1	ALC	Vacunado	2	-	-
1	ALL	Vacunado	2	-	-
1	ALM	Vacunado	2	-	-
1	AMU	Vacunado	2	-	-
2	ALA	Vacunado	1	-	-
2	AMA	Vacunado	1	-	-
2	APD	Vacunado	1	-	-
2	APG	Vacunado	1	-	-
2	APT	Vacunado	1	-	-
3	ALT	Control	N/A	+/-	-
3	AMS	Control	N/A	+	-
3	AKX	Control	N/A	+	-
3	ALX	Control	N/A	+	+/-
3	AMI	Control	N/A	-	-

"+" Lesión grave coherente o patognómica para una infección de gripe
 "+/-" Lesiones leves (no concluyente)
 "-" Normal

EJEMPLO 24 – ESTUDIO DE EFICACIA DE VACUNA DE GRIPE CANINA

5 El siguiente estudio se realizó para determinar: (1) la eficacia de vacunas de gripe equina H3N8 multivalentes frente a monovalentes contra virus de gripe canina en perros, y (2) el efecto de la vía de administración en la eficacia de la vacuna.

10 Procedimiento:

Se obtuvieron treinta mestizos de 10 semanas de edad de un proveedor comercial. Los perros se asignaron aleatoriamente a 6 grupos como se muestra en la Tabla 46, y se alojaron en una instalación de investigación.

Tabla 46. Diseño experimental

Grupo	Número de perros	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de dosis	Edad en la vacunación (semanas)
1	5	VAX-1	IN	2	10 y 14
2	5	VAX-2	SQ	2	10 y 14
3	5	VAX-2	IN	2	10 y 14
4	5	VAX-3	SQ	2	10 y 14
5	5	VAX-3	IN	2	10 y 14
6	5	Control	--	-	--

ES 2 393 406 T3

Se usaron tres tipos de vacunas (VAX-1, VAX-2, y VAX-3). La VAX-1 fue una vacuna monovalente de virus de gripe equina (A/Equino/KY/02) inactivado con adyuvante HAVLOGEN®, y cada dosis contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 6144 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal 10%, 0,1% (v/v) de rojo de fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para llevar el volumen de dosis total a 1 ml. La VAX-2 fue una
 5 vacuna monovalente de virus de gripe equina (A/equino/KY/02) inactivado con adyuvante HAVLOGEN®, y cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 4096 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal 10%, 0,1% (v/v) de rojo de fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para llevar el volumen de dosis total a 1 ml. La VAX-3 fue una vacuna multivalente de gripe equina (A/equino/KY/02, A/equino/KY/93, y A/equino/NM/2/93) inactivada con adyuvante HAVLOGEN®, y contenía HAVLOGEN® (10% v/v),
 10 2048 unidades de HA de virus inactivado por cepa, 0,1% (v/v) de timerosal 10%, 0,1% (v/v) de rojo de fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para llevar el volumen de dosis total a 1 ml. Todos los virus de la gripe usados para la formulación de vacuna se inactivaron por etilenimina binaria (BEI) usando un método convencional.

15 Las vacunas y vías de administración para cada grupo se describen en la Tabla 46. Todos los perros en los grupos vacunados se vacunaron por la vía intranasal (IN) o la subcutánea (SQ), y cada perro recibió dos dosis. La segunda dosis (es decir, refuerzo) se administró cuatro semanas después de la primera dosis. Se recogieron muestras sanguíneas para evaluar la titulación de HI usando un protocolo convencional con un aislado de gripe canina H3N8 los días 0 (antes de la vacunación), 7 y 14 después de la primera y segunda vacunaciones. Siete días antes de la
 20 exposición, los perros se movieron a una instalación BSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

Todos los perros vacunados y de control de edad coincidente se expusieron por vía oronasal a un virus de gripe canina virulento ($10^{7,4}$ DICT50 de A/Canino/Florida/242/2003 por perro) a las 2 semanas después de la segunda vacunación. El virus de exposición se administró como una nebulización usando un nebulizador (Nebulair™) en un
 25 volumen de 2 ml por día. Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con gripe durante 14 días después de la exposición. Se recogieron muestras sanguíneas los días 7 y 14 después de la exposición para determinación de la titulación de HI. Todos los perros se sacrificaron el día 14 después de la exposición, y se recogieron muestras de pulmón y tráquea en formalina tamponada 10% para histopatología. Las asignaciones de puntuación de señal clínica usadas para la observación después de exposición se muestran en la Tabla 47.

30 Resultados:

Todos los perros vacunados por la vía SQ desarrollaron respuestas de titulación de anticuerpo de HI al aislado de virus de gripe canina, independientemente del tipo de vacuna (Tabla 48). Ninguno de los perros de los grupos de
 35 vacunación IN (es decir, grupos 1, 3 y 5) desarrollaron respuestas de titulación de anticuerpos de HI al aislado de virus de gripe canina, independientemente del tipo de vacuna, durante el periodo posterior a la vacunación. Hubo, sin embargo, un aumento de 4 veces en la titulación el día 14 después de la exposición en todos los perros indirectamente, lo que indica que todos los perros se expusieron al virus de exposición (Tabla 47).

40 Todos los perros mostraron una o más de las siguientes señales clínicas de gripe canina: fiebre ($>103,0$ °F; $>39,4$ °C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso y disnea. Las vacunas tuvieron señales clínicas menos graves, en comparación con controles de edad coincidente (Tabla 49). Hubo una reducción significativa de las señales clínicas en perros vacunados con VAX-3 por la vía SC (grupo 4). En este experimento, la administración IN de VAX-1, VAX-2 o VAX-3
 45 no proporcionó una reducción significativa de señales clínicas de virus de gripe canina.

Como en los Ejemplos 22 y 23, se realizó evaluación histopatológica de muestras tisulares de pulmón y traqueales con respecto a lesiones para identificar lesiones compatibles con o patognómicas para enfermedad de gripe canina. La Tabla 50 proporciona un sumario del alcance de las lesiones en este experimento para los perros. Cinco de 5
 50 perros de control (grupo 6) tuvieron lesiones pulmonares coherentes con una infección de gripe. Dos de 5 perros vacunados con VAX-2 por la vía SC (grupo 2) y 3 de 5 perros vacunados con VAX-3 por la vía SC (grupo 4) estaban sin ninguna lesión pulmonar relacionada con gripe. Todos los perros que recibieron la vacuna por la vía intranasal, independientemente del tipo de vacuna, tuvieron lesiones pulmonares graves coherentes con una infección de gripe. Las lesiones de la tráquea observadas en este estudios fueron muy leves.

55 Conclusión:

Los resultados de este estudio demuestran que: (1) el virus de gripe equina H3N8 inactivado puede inducir respuestas de anticuerpo de HI reactivo de forma cruzada con virus de gripe canina en perros vacunados por la vía
 60 SQ, (2) la administración intranasal de vacuna monovalente (VAX-1 y VAX-2) o multivalente (VAX-3) no fue eficaz en perros, y (3) la administración subcutánea de vacuna multivalente (VAX-3) proporcionó una reducción significativa (P=0,016) en la gravedad de enfermedad de virus de gripe canina en perros.

Tabla 47. Señales clínicas y sistema de puntuación	
Señales clínicas	Puntuación por día
Temperatura	
<103, °F (<39, °C)	0
1030 -103.9 °F (39,4-39,94 °C)	2
104,0-104,9 °F (40,0-40,50 °C)	3

Tabla 47. Señales clínicas y sistema de puntuación	
Señales clínicas	Puntuación por día
Temperatura	
>105,0 °F(>40,6 °C)	4
Tos	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxística	4
Estornudos	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
Descarga nasal	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Descarga ocular	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Hemoptisis	
No	0
Sí	5
Depresión	
No	0
Sí	1
Anorexia	
No	0
Sí	1
Señales respiratorias	
Ninguna	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
Expectorado mucoso	
No	0
Sí	2
Vómitos	
No	0
Sí	1
Anomalías fecales	
No	0
Sí	1

Tabla 48. Serología-titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Nº de dosis	Titulación de HI							
					Días después de la vacunación						Días después de exposición	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	248	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	40
1	501	Vacunado	IN	2	<10	10	<10	<10	<10	<10	160	160
1	502	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
1	469	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
1	46A	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80

ES 2 393 406 T3

Tabla 48. Serología-titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Nº de dosis	Titulación de HI							
					Días después de la vacunación						Días después de exposición	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
2	232	Vacunado	SQ	2	<10	<10	<10	20	20	40	320	640
2	511	Vacunado	SQ	2	<10	10	10	20	20	20	160	640
2	514	Vacunado	SQ	2	<10	<10	40	40	80	40	160	320
2	461	Vacunado	SQ	2	<10	10	10	20	20	20	>640	>640
2	463	Vacunado	SQ	2	<10	10	40	80	80	40	80	320
3	246	Vacunado	IN	2	<10	10	<10	<10	<10	<10	40	40
3	505	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
3	506	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
3	464	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
3	465	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
4	23B	Vacunado	SQ	2	<10	10	10	40	40	20	160	160
4	247	Vacunado	SQ	2	<10	<10	<10	20	20	20	160	320
4	508	Vacunado	SQ	2	<10	10	40	40	80	80	320	320
4	512	Vacunado	SQ	2	<10	<10	20	20	80	80	320	160
4	516	Vacunado	SQ	2	<10	10	10	20	80	80	160	>640
5	503	Vacunado	IN	2	<10	10	<10	<10	<10	<10	80	160
5	513	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
5	462	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	320
5	466	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
5	46B	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	236	Control	-	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	504	Control	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160
6	507	Control	-	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	515	Control	-	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	468	Control	-	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160

* Primera vacunación
 ** Segunda vacunación
 *** Día de exposición

Tabla 49. Análisis de puntuaciones clínicas de enfermedad de gripe canina totales

Grupo	Tratamiento	Vía de vacunación	Puntuación media total por perro	P-valor*
1	VAX-1	IN	35,2	0,500 (grupo 1 frente a 6)
2	VAX-2	SQ	31,0	0,345 (grupo 2 frente a 6)
3	VAX-2	IN	39,4	0,631 (grupo 3 frente a 6)
4	VAX-3	SQ	13,0	0,016 (grupo 4 frente a 6)

ES 2 393 406 T3

Tabla 49. Análisis de puntuaciones clínicas de enfermedad de gripe canina totales				
Grupo	Tratamiento	Vía de vacunación	Puntuación media total por perro	P-valor*
5	VAX-3	IN	42,6	0,790 (grupo 4 frente a 6)
6	Control	--	36,8	--

* Analizado usando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 8.2 (los grupos de vacuna se compararon usando el ensayo de suma de rangos Wilcoxon)

Tabla 50. Evaluación histopatológica de muestras tisulares						
Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de dosis	Lesión microscópica (Histopatología)	
					Pulmón	Tráquea
1	248	Vacunado	IN	2	+	-
1	501	Vacunado	IN	2	+	-
1	502	Vacunado	IN	2	+	-
1	469	Vacunado	IN	2	+	+
1	46A	Vacunado	IN	2	+	+
2	232	Vacunado	SQ	2	+	-
2	511	Vacunado	SQ	2	+	-
2	514	Vacunado	SQ	2	-	-
2	461	Vacunado	SQ	2	+	-
2	463	Vacunado	SQ	2	-	-
3	246	Vacunado	IN	2	+	-
3	505	Vacunado	IN	2	+	-
3	506	Vacunado	IN	2	+	+
3	464	Vacunado	IN	2	+	-
3	465	Vacunado	IN	2	+	+
4	23B	Vacunado	SQ	2	-	-
4	247	Vacunado	SQ	2	+/-	-
4	508	Vacunado	SQ	2	-	-
4	512	Vacunado	SQ	2	-	+/-
4	516	Vacunado	SQ	2	+	+
5	503	Vacunado	IN	2	+	+/-
5	513	Vacunado	IN	2	+	+
5	462	Vacunado	IN	2	+	+/-
5	466	Vacunado	IN	2	+	+
5	46B	Vacunado	IN	2	+	-
6	236	Control	--	2	+	-
6	504	Control	--	2	+	+
6	507	Control	--	2	+	+
6	515	Control	--	2	+	+/-
6	468	Control	--	2	+	+

"+" Lesión grave coherente o patognómica para una infección de gripe
 "+/-" Lesión leve (no concluyente)
 "-" Normal

ES 2 393 406 T3

EjemPlo 25 – estudio de Eficacia de Vacuna de GriPe Canina

La enfermedad de gripe canina está causada por un virus de gripe H3N8 (CIV). CIV está cercanamente relacionado con los virus H3N8 equinos (Crawford *et al.*, 2005) e infecta a todos los perros expuestos. Aproximadamente el 80% de los perros expuestos desarrollan señales clínicas. En el siguiente estudio se determinó la eficacia de una vacuna de virus de gripe equina H3N8 inactivado y una vacuna de virus de gripe canina.

Procedimiento:

Se usaron treinta y cinco beagles y cinco mestizos en el presente estudio. Los beagles se asignaron aleatoriamente a tres grupos (Tabla 51). Todos los mestizos se asignaron al grupo de control (grupo 3). Todos los perros se alimentaron con una dieta de crecimiento convencional y el agua estuvo disponible a voluntad.

Grupo	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de perros	Edad en la vacunación (semanas)	Exposición
1	VAX-1	IM	15	8 y 12	Sí
2	VAX-2	SC	5	-8 y 12	Sí
3	Control	N/A	20	N/A	Sí

Los perros en los grupos 1 y 2 se vacunaron con VAX-1 o 2-VAX (Tabla 51). VAX-1 era una vacuna de virus de gripe equina (A/equino/KY/02) inactivado con adyuvante HAVLOGEN®. Para la preparación de la vacuna, el virus de la vacuna se inactivó por etilenimina binaria (BEI) usando un método convencional. Cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 6144 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal 10%, 0,1% (v/v) de rojo de fenol y suficiente PBS para llevar el volumen de dosis total a 1 ml y suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2.

VAX-2 era una vacuna de antígeno de gripe con adyuvante CARBIGENTM inactivado (A/canino/F1/43/2004). El A/canino/F1/43/2004 se inactivó por etilenimina binaria ("BEI") usando un método convencional. Cada dosis de la vacuna contenía un 5% en masa de CARBIGENTM, aproximadamente 1280 unidades de HA del virus inactivado, suficiente PBS para llevar el volumen total de la dosis a 1 ml, y suficiente NaOH para ajustar el pH a un valor comprendido entre 7,2 y 7,4. Se recogieron muestras de suero de todos los perros el día de la primera y segunda vacunación, el día 7 y 14 después de la primera y segunda vacunaciones, y antes de la exposición para determinar las titulaciones de HI usando un protocolo convencional de virus de gripe equina H3N8 (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Siete días antes de la exposición, los perros se movieron a una instalación ABSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

Todos los perros vacunados y de control de edad coincidente se expusieron por vía oronasal a virus de gripe canina virulento (10^{7,2} DICT50 de A/Canino/Florida/242/2003 por perro) a las 2 semanas después de la segunda vacunación. El virus de exposición se administró como una nebulización (2 ml/perro) usando un nebulizador (NEBULAIR™). Los perros se observaron con respecto a señales clínicas relacionadas con gripe durante 14 días después de la exposición. Se recogieron hisopos nasales y orofaríngeos diariamente en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte de virus para aislamiento de virus del día -1 (es decir, un día antes de la exposición) al día 14 después de la exposición. Se recogieron muestras sanguíneas los días 7 y 14 después de la exposición para determinación de titulación de HI. Las asignaciones de puntuación de señal clínica usadas para observación posterior a la exposición se muestran en la Tabla 52.

Resultados:

Todos los perros vacunados (grupos 1 y 2) desarrollaron respuestas de titulaciones de anticuerpo de HI para el aislado de virus de gripe canina (Tabla 53). Todos los perros mostraron una o más de las siguientes señales de gripe canina: fiebre (> 103,0 °F, > 39,4 °C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión y anorexia. Los vacunados tuvieron señales clínicas menos graves, en comparación con controles de edad coincidente (Tabla 54). Hubo una reducción significativa (P <0,001) en señales clínicas en perros vacunados con VAX-1 (grupo 1) o VAX-2 (grupo 2).

Se muestran resultados de aislamiento de virus en las Tablas 55 y 56. Después de una exposición a virus de gripe canina virulento, el virus de gripe canina se aisló de 5 de 15 (33%) perros de grupo 1 (VAX-1), 0 de 5 (0%) perros del grupo 2 (VAX-2) y 17 de 20 (85%) controles (grupo 3). Los vacunados tanto con vacuna de gripe equina inactivada (VAX-1) como con virus de gripe canina (VAX-2) demostraron una reducción significativa (P = 0,004) en difusión viral en secreciones nasales u orales o ambas (Tabla 55) en comparación con los controles.

Conclusión:

Los resultados de este estudio demuestran que: (1) las vacunas de virus de gripe equina H3N8 inactivado y virus de gripe canina pueden inducir respuestas de anticuerpo HI reactivo a virus de gripe canina en perros vacunados, (2) el

ES 2 393 406 T3

uso de una vacuna de virus de gripe canina o virus de gripe equina H3N8 puede reducir la gravedad de la enfermedad por virus de gripe canina en perros, y (3) el uso de una vacuna de virus de gripe canina o virus de gripe equina H3N8 puede reducir la excreción de virus en secreciones nasales y/u orales.

Tabla 52. Señales clínicas y sistema de puntuación	
Señales clínicas	Puntuación por día
Temperatura	
<103,0 °F (<39,4 °C)	0
103,0 – 103,9 °F (39,4 – 39,94 °C)	2
104,0-104,9 °F (40,0-40,5 °C)	3
>105,0 °F (>40,6 °C)	4
Tos	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxística	4
Estornudos	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
Descarga nasal	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Descarga ocular	
Sin descarga	0
Serosa ligera	1
Serosa copiosa	1
Mucopurulenta ligera	2
Mucopurulenta copiosa	3
Hemoptisis	
No	0
Sí	5
Depresión	
No	0
Sí	1
Anorexia	
No	0
Sí	1
Señales respiratorias	
Ninguna	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
Expectorado mucoso	
No	0
Sí	2
Vómitos	
No	0
Sí	1
Anomalías fecales	
No	0
Sí	1

Tabla 53. Serología – Titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Titulación de HI							
				Días después de vacunación				Días después de exposición			
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	AYS	Vacunado	IM	<10	<10	<10	20	40	40	80	>640
1	AZV	Vacunado	IM	<10	<10	<10	20	40	40	160	>640
1	BAD	Vacunado	IM	<10	<10	<10	40	40	80	80	320
1	BAE	Vacunado	IM	<10	<10	10	20	20	20	40	320
1	BAH	Vacunado	IM	<10	<10	10	10	40	40	160	>640
1	BAJ	Vacunado	IM	<10	<10	10	20	80	80	40	320
1	BAN	Vacunado	IM	<10	10	10	20	40	40	40	320
1	BBN	Vacunado	IM	<10	10	10	20	80	80	40	320
1	BBT	Vacunado	IM	<10	<10	<10	20	40	40	40	160
1	BBY	Vacunado	IM	<10	<10	<10	20	80	80	160	>640
1	BCS	Vacunado	IM	<10	10	40	40	160	160	160	160
1	BCZ	Vacunado	IM	<10	10	10	20	80	40	160	160
1	BDP	Vacunado	IM	<10	<10	<10	20	40	40	80	>640
1	BEE	Vacunado	IM	<10	10	20	40	80	80	160	320
1	BEY	Vacunado	IM	<10	<10	10	10	40	40	160	160
2	AZH	Vacunado	SC	<10	<10	10	20	80	80	160	160
2	AZT	Vacunado	sc	<10	<10	10	10	40	80	320	>640
2	BBC	Vacunado	sc	<10	<10	20	40	160	160	80	160
2	BCM	Vacunado	SC	<10	<10	10	20	80	40	80	160
2	BEB	Vacunado	SC	<10	<10	<10	10	20	40	80	160
3	AYT	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320
3	AZJ	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	160
3	AZL	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160
3	AZN	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160
3	BAB	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320

Tabla 53. Serología – Titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Titulación de HI							
				Días después de vacunación				Días después de exposición			
				0*	7	14	28"	35	42***	7	14
3	BBD	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	>640
3	BBU	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160
3	BBZ	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	160
3	BCC	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320
3	BCD	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	>640
3	BCG	Control	N/A	<10	<14	<10	<10	<10	<10	40	>640
3	BCI	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	320
3	BCL	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	>640

Tabla 53. Serología – Titulaciones de inhibición de hemaglutinación											
Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Titulación de HI							
				Días después de vacunación				Días después de exposición			
				0*	7	14	28"	35	42***	7	14
3	BCV	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	320
3	BDU	Control	N/A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	>640
3	MFI	Control	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	80	320
3	MFJ	Control	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	40	320
3	MFK	Control	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	80	320
3	MFR	Control	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	80	320
3	MFS	Control	N/A	NT	NT	NT	NT	<10	<10	160	>640

* Primera vacunación
 **Segunda vacunación
 *** Día de exposición

Tabla54. Análisis de mutaciones clínicas de enfermedad gripal canina totales			
Grupo	Tratamiento	Puntuación media total por perro	P-valor*
1	VAX-1	9,1	< 0,001 (grupo 1 frente a 3)
2	VAX-2	5,4	< 0,001 (grupo 2 frente a 3)
3	Control	24,1	-

*Analizado usando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 9.1 (los grupos de vacunas se compararon usando el procedimiento GLM)

Tabla 55. Difusión viral después de exposición			
Grupo	Tratamiento	Porcentaje de perros que excretaron el virus	P-valor*
1	VAX-1	33% (5/15)	0,004 (grupo 1 frente a 3)
2	VAX-2	0% (0/5)	0,004 (grupo 2 frente a 3)
3	Control	85% (17/20)	-

* Analizado usando un procedimiento FREQ de SAS® (Versión 9.1) y P-valor asociado con ensayo exacto de Fisher

Tabla 56. Serología – Titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Via de vacunación	Días después de exposición																
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	AYS	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	AZV	Vacunado	IM	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAD	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAE	Vacunado	IM	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAH	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAJ	Vacunado	IM	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BAN	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BBN	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BBT	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BBY	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BCS	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BCZ	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BDP	Vacunado	IM	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BEE	Vacunado	IM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	BEY	Vacunado	IM	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	AZH	Vacunado	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	AZT	Vacunado	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	BBC	Vacunado	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	BCM	Vacunado	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	BEB	Vacunado	SC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AYT	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZJ	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZL	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N

Tabla 56. Serología – Titulaciones de inhibición de hemaglutinación

Nº Grupo	ID de perro	Tratamiento	Via de vacunación	Días después de exposición																					
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14						
3	AZN	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
3	BAB	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BBD	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BBU	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BBZ	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCC	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCD	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCG	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCI	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCL	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCV	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BDU	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFI	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFJ	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFK	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFR	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFS	Control	N/A	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N- Sin virus aislado de hisopos orales o nasales
P - Virus aislado de hisopos nasales u orales o nasales y orales.

Tabla 57. Similitudes de secuencias de aminoácidos de genes de hemaglutinina, neuraminidasa y nucleoproteína entre virus de la gripe		
Gen (Canino/Florida/43/2004)	Similitud de secuencia de aminoácidos	Gen de virus de la gripe usado para comparación
Hemaglutinina	88	Equino/Argelia/72
HA	90	Equino/Sao Paulo/6/69
HA	91	Equino/Miami/1/63
HA	93	Equino/Newmarket/79
HA	94	Equino/Kentucky/1/81
HA	95	Equi-2/Ludhiana/87
HA	96	Equino/Alaska/1/91
HA	97	Equino/Tennessee/5/86
HA	98	Equino/Kentucky/5/02
HA	99	Equino/Ohio/1/2003
HA	99	Canino/Florida/242/2003
Neuraminidasa	88	Eq/Argelia/72
NA	90	Equino/Sao Paulo/6/69
NA	91	Equino/Miami/1/63
NA	93	Equino/Newmarket/79
NA	94	Equino/Kentucky/1/81
NA	95	Equi-2/Ludhiana/87
NA	96	Equino/Santiago/85
NA	97	Equino/Tennessee/5/86
NA	98	Equino/Kentucky/5/2002
NA	99	Equino/Ohio/1/2003
NA	99	Canino/Florida/242/2003
Nucleoproteína ("NP")	94	equi/Miami/1/63
NP	97	Equino/Kentucky/1/81
NP	99	Equino/Kentucky/5/02
NP	99	Equino/Ohio/1/2003
NP	99	Canino/Florida/242/2003

Las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" en la presente patente (incluyendo las reivindicaciones) deben interpretarse de forma inclusiva en lugar de exclusiva.

- 5 Se pretende que la descripción detallada anterior de realizaciones preferidas solamente informe a otros expertos en la materia de la invención, sus principios y su aplicación práctica de modo que otros expertos en la materia puedan adaptar y aplicar la invención en sus numerosas formas, según puedan adaptarse mejor a los requisitos de un uso particular. La presente invención, por lo tanto, no se limita a las realizaciones anteriores, y puede modificarse de diversas formas.

10

BIBLIOGRAFÍA

- Patente de Estados Unidos N° 5.106.739
- 5 Patente de Estados Unidos N° 5.034.322
- Patente de Estados Unidos N° 6.455.760
- 10 Patente de Estados Unidos N° 6.696.623
- Patente de Estados Unidos N° 4.683.202
- Patente de Estados Unidos N° 4.683.195
- 15 Patente de Estados Unidos N° 4.800.159
- Patente de Estados Unidos N° 4.965.188
- 20 Patente de Estados Unidos N° 5.994.056
- Patente de Estados Unidos N° 6.814.934
- Patente de Estados Unidos N° 6.436.408
- 25 Patente de Estados Unidos N° 6.398.774
- Patente de Estados Unidos N° 6.177.082
- 30 Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 20040078841
- Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 20040067506
- Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 20040019934
- 35 Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 20030177536
- Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 20030084486
- 40 Publicación de solicitud de Estados Unidos N° 20040123349
- Greyhound Daily News, 1/28/99. National Greyhound Association (NGA), Abilene, Kansas. <http://www.NGAgrey-hounds.com>.
- 45 Comunicación personal, Dr. William Duggar, veterinarian at Palm Beach Kennel Club, West Palm Beach, Florida.
- Altschul, S. F. *et al.* (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" *J. Mol. Biol.* 215: 402-410.
- 50 Altschul, S. F. *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs" *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- An, G. (1987) "Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis" *Methods Enzymol.* 153: 292-305.
- 55 Beltz, G. A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods" *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100: 266-285.
- 60 Burleson, F. *et al.* (1992) *Virology: A Laboratory Manual* (Academic Press).
- Byars, N.E., A.C. Allison (1987) "Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity" *Vaccine* 5: 223-228.
- 65 Crawford, P.C. *et al.* (2005) "Transmission of equine influenza virus to dogs" *Science* 310: 482-485.
- Chang, C.P. *et al.* (1976) "Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan" *Int J*

- Zoonoses 3: 61-64.
- 5 Dacso, C.C. *et al.* (1984) "Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections" *J Clin Microbiol* 20: 833-835.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(1): 21-25.
- 10 Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5: 164.
- Fields *et al.* (1946) *Fields Virology*, 3rd ed., Lippincott-Raven publishers.
- Ford, R.B., Vaden, S.L (1998) "Canine infectious tracheobronchitis" In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2nd edition, C.E. Greene, editor, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 33-38.
- 15 Fouchier *et al.*, (2000) *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11): 4096-4101.
- Good, X. *et al.* (1994) "Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase" *Plant Molec. Biol.* 26: 781-790.
- 20 Guan, Y. *et al.* (2004) "H5N1 influenza: a protean pandemic threat" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8156-8161.
- Guo, Y. *et al.* (1992) "Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China" *Virology* 188: 245-255.
- 25 Houser, R.E. *et al.* (1980) "Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza" *Can J Comp Med* 44: 396-402.
- Karasin, A.I. *et al.* (2000) "Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada" *J Virol* 74: 9322-9327.
- 30 Karlin S. and Altschul, S. F. (1990) "Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268.
- 35 Karlin S. and Altschul, S. F. (1993) "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877.
- Kawaoka, Y. *et al.*, (1989) "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics" *J Virol* 63: 4603-4608.
- 40 Keawcharoen, J. *et al.* (2004) "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards" *Emerg infect Dis* 10: 2189-2191.
- Kendal, A. P. *et al.* (1982) In *Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance*. A. P. Kendal, M. S. Pereira, J. J. Skehel, Eds. (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and Pan-American Health Organization, Atlanta, GA, Estados Unidos) pp. B17-B35.
- 45 Kilbourne, E.D. *et al.* (1975) "Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs" *Intervirology* 6: 315-318.
- 50 Kimura, K. *et al.* (1998) "Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host" *Mayo Clin Proc* 73: 243-245.
- Klimov, A. I. *et al.* (1992a) "Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/ 134/57 (H2N2) virus" *Virology* 186: 795-797.
- 55 Klimov A. *et al.* (1992b) "Subtype H7 influenza viruses: comparative antigenic and molecular analysis of the HA-, M-, and NS-genes." *Arch Virol.* 122: 143-161.
- Kovacova, A. *et al.* (2002) "Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins" *Virus Genes* 24: 57-63.
- 60 Kuiken, T. *et al.* (2004) "Avian H5N1 influenza in cats" *Science* 306: 241.
- 65 Kumar, S. *et al.* (2004) "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment" *Brief Bioinform* 5: 150-163.

- Lee, L.G. *et al.* (1993) "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes" *Nucleic Acids Res.* 21(16): 3761-3766.
- 5 Lewin, B. (1985) *Genes II*, John Wiley & Sons, Inc., p. 96.
- Lipatov, A.S. *et al.* (2004) "Influenza: emergence and control" *J Virol* 78: 8951-8959.
- 10 Livak, K. J. *et al.* (1995) "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization" *PCR Methods Appl.* 4(6): 357-362.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982) "Nuclease Bal31" *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 15 Matrosovich, M. *et al.* (2000) "Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals" *J Virol* 74: 8502-8512.
- Maertzdorf *et al.*, (2004) *Clin Microbiol.* 42(3): 981-986.
- 20 Merrifield, R.B. (1963) "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide" *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-2154.
- Nikitin, A. *et al.* (1972) "Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs" *Bull World Health Organ* 47: 471-479.
- 25 Nobusawa, E. *et al.* (1991) "Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses" *Virology* 182: 475-485.
- Patriarca, P.A. *et al.* (1984) "Lack of significant person-to person spread of swine influenza-like virus following fatal infection in an immunocompromised child" *Am J Epidemiol* 119: 152-158.
- 30 Payungporn S. *et al.* (2006a) "Detection of canine influenza A virus (H3N8) RNA by realtime RT-PCR" (in preparation for *Journal of Clinical Microbiology*).
- Payungporn S, *et al.* (2006b) "Isolation and characterization of influenza A subtype H3N8 viruses from dogs with respiratory disease in a shelter and veterinary clinic in Florida" (in preparation for *Emerging Infectious Diseases*).
- 35 Peiris, M. *et al.* (1999) "Human infection with influenza H9N2" *Lancet* 354: 916-917.
- Peiris, J.S. *et al.* (2004) "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease" *Lancet* 363: 617-619.
- 40 Posnett, D. N. *et al.* (1988) "A Novel Method for Producing Anti-peptide Antibodies" *J. Biol. Chem.* 263(4): 1719-1725.
- Putnam, Bob (February 10, 1999) "Two illnesses seen in death of dogs" *St. Petersburg Times*.
- 45 Reid, A.H. *et al.* (2004) "Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus" *Nat Rev Microbiol* 2: 909-914.
- 50 Rowe, T. *et al.* (1999) "Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays" *J Clin Microbiol* 37: 937-943.
- Saiki, R. (1985) "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" *Science* 230: 1350-1354.
- 55 Sambrook, J. *et al.* (1989) "Plasmid Vectors" In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, pp. 1.82-1.104. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Subbarao, K. *et al.* (1998) "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness" *Science* 279: 393-396.
- 60 Suzuki, Y. *et al.* (2000) "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses" *J Virol* 74: 11825-11831.
- Tarn, J. P. (1988) "Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System" *PNAS USA* 85(15): 5409-5413.
- 65

Top, Jr., F.H. *et al.* (1977) "Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). IV. Summary and speculation" *J Infect Dis* 136 Suppl: S376-S380.

5 Vines, A. *et al.* (1998) "The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction" *J Virol* 72: 7626-7631.

Wagner, R. *et al.* (2002) "N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication" *J Gen Virol* 83: 601-609.

10 Webby, R. *et al.* (2004) "Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens" *Nat Med* 10: S77-S81.

Webster, R.G. (1998) "Influenza: an emerging disease" *Emerg Infect Dis* 4: 436-441.

15 Webster, R.G. *et al.* (1992) "Evolution and, ecology of influenza A viruses" *Microbiol Rev* 56: 152-179.

Weis, W. *et al.* (1988) "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid" *Nature* 333: 426-431.

20 Womble, D.D. (2000) "GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs" *Methods Mol Biol* 132: 3-22.

Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. W., Wu, R. *et al.* (1993) "Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants" *Plant Molecular Biology* 22: 573-588.

25 Yang, T. T. *et al.* (1996) "Optimized Codon Usage and Chromophore Mutations Provide Enhanced Sensitivity with the Green Fluorescent Protein" *Nucleic Acid Research* 24(22): 4592-4593.

30 Yoon K-Y. *et al.* (2005) "Influenza virus infection in racing greyhounds" *Emerg Infect Dis*. 11: 1974-1975.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Crawford, Patti Cynthia Gibbs, E. Paul J. Dubovi, Edward J. Donis, Ruben Omar Katz, Jacqueline M. Klimov, Alexander I. Lakshmanan, Nallakannu P. Lum, Melissa Anne Goovaerts, Daniel Ghislina Emiel Mellencamp, Mark William

<120> Materiales y métodos para combatir enfermedades respiratorias en cánidos

40 <130> UF-445XC2

<150> US 11/409.416
<151> 21-04-2006

45 <150> US 60/728.449
<151> 19-10-2005

<150> US 60/754.881
<151> 29-12-2005

50 <150> US 60/759.162
<151> 14-01-2006

55 <150> US 60/761.451
<151> 23-01-2006

<150> US 60/779.080
<151> 03-03-2006

60 <160> 88
<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 2277
<212> ADN

65 <213> Virus de la gripe

275	280	285	
att ggt gga ata agg atg gta gac atc ctt aag cag aat cca aca gag Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu 290 295 300			912
gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca gca atg gga ttg aga att agc Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305 310 315 320			960
tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc ttc aaa aga aca agt gga tca Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser 325 330 335			1008
tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt acg ggc aac ctt caa aca ttg Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu 340 345 350			1056
aaa ata aga gtg cat gag ggc tat gaa gaa ttc aca atg gtc gga aga Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg 355 360 365			1104
aga gca aca gcc att atc aaa aag gca acc aga aga ttg att caa ttg Arg Ala Thr Ala Ile Ile Lys Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu 370 375 380			1152
ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca att gct gaa gca ata att gta Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val 385 390 395 400			1200
gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly 405 410 415			1248
gat ttg aac ttt gtt aat aga gca aat cag cgt ttg aac ccc atg cat Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His 420 425 430			1296
caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc cac aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe His Asn 435 440 445			1344
tgg gga att gaa ccc atc gac aat gta atg ggg atg att gga ata ttg Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu 450 455 460			1392
oct gac atg acc cca agc acc gag atg tca ttg aga gga gtg aga gtc Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val 465 470 475 480			1440
agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc agc act gag aga gtg gtg gtg Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val 485 490 495			1488
agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg gat caa agg gga aac ata cta Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu 500 505 510			1536
ctg tcc cct gaa gaa gtc agt gaa aca caa gga acg gaa aag ctg aca Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr			1584

ES 2 393 406 T3

515					520					525						
ata	att	tat	tcg	tca	tca	atg	atg	tgg	gag	att	aat	ggt	ccc	gaa	tca	1632
Ile	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ser	Met	Met	Trp	Glu	Ile	Asn	Gly	Pro	Glu	Ser	
	530					535					540					
gtg	ttg	gtc	aat	act	tat	caa	tgg	atc	atc	agg	aac	tgg	gaa	att	gta	1680
Val	Leu	Val	Asn	Thr	Tyr	Gln	Trp	Ile	Ile	Arg	Asn	Trp	Glu	Ile	Val	
	545				550					555					560	
aaa	att	cag	tgg	tca	cag	gac	ccc	aca	atg	tta	tac	aat	aag	ata	gaa	1728
Lys	Ile	Gln	Trp	Ser	Gln	Asp	Pro	Thr	Met	Leu	Tyr	Asn	Lys	Ile	Glu	
				565					570					575		
ttt	gag	cca	ttc	caa	tcc	ctg	gtc	cct	agg	gcc	acc	aga	agc	caa	tac	1776
Phe	Glu	Pro	Phe	Gln	Ser	Leu	Val	Pro	Arg	Ala	Thr	Arg	Ser	Gln	Tyr	
			580					585					590			
agc	ggt	ttc	gta	aga	acc	ctg	ttt	cag	caa	atg	cga	gat	gta	ctt	gga	1824
Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Thr	Leu	Phe	Gln	Gln	Met	Arg	Asp	Val	Leu	Gly	
		595				600						605				
aca	ttt	gat	act	gct	caa	ata	ata	aaa	ctc	ctc	cct	ttt	gcc	gct	get	1872
Thr	Phe	Asp	Thr	Ala	Gln	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Ala	Ala	
	610					615					620					
cct	ccg	gaa	cag	agt	agg	atg	cag	ttc	tct	tct	ttg	act	gtt	aat	gta	1920
Pro	Pro	Glu	Gln	Ser	Arg	Met	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Val	
					630					635					640	
aga	ggt	tcg	gga	atg	agg	ata	ctt	gta	aga	ggc	aat	tcc	cca	gtg	ttc	1968
Arg	Gly	Ser	Gly	Met	Arg	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Phe	
				645					650					655		
aac	tac	aat	aaa	gcc	act	aaa	agg	ctc	aca	gtc	ctc	gga	aag	gat	gca	2016
Asn	Tyr	Asn	Lys	Ala	Thr	Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Asp	Ala	
			660					665					670			
ggt	gcg	ctt	act	gag	gac	cca	gat	gaa	ggt	acg	gct	gga	gta	gaa	tct	2064
Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Pro	Asp	Glu	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Glu	Ser	
		675					680						685			
gct	gtt	cta	aga	ggg	ttt	ctc	att	tta	ggt	aaa	gag	aac	aag	aga	tat	2112
Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Lys	Glu	Asn	Lys	Arg	Tyr	
	690					695						700				
ggc	cca	gca	cta	agc	atc	aat	gaa	cta	agc	aaa	ctt	gca	aaa	ggg	gag	2160
Gly	Pro	Ala	Leu	Ser	Ile	Asn	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Lys	Gly	Glu	
					710					715					720	
aaa	gcc	aat	gta	cta	att	ggg	caa	ggg	gac	gta	gtg	ttg	gta	atg	aaa	2208
Lys	Ala	Asn	Val	Leu	Ile	Gly	Gln	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Val	Met	Lys	
					725				730					735		
cgg	aaa	cgt	gac	tct	agc	ata	ctt	act	gac	agc	cag	aca	gcg	acc	aaa	2256
Arg	Lys	Arg	Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Thr	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Thr	Lys	
			740					745					750			
agg	att	cgg	atg	gcc	atc	aat										2277
Arg	Ile	Arg	Met	Ala	Ile	Asn										

ES 2 393 406 T3

<210> 2
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 2

Met Glu Arg Ile Glu Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Glu Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
 85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro
 100 105 110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
 115 120 125

Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
 130 135 140

Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
 145 150 155 160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Ile Ile
 165 170 175

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205

ES 2 393 406 T3

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr
 210 215 220

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
 245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
 260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285

Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Lys Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe His Asn
 435 440 445

ES 2 393 406 T3

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr
580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
 690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
 705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
 725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
 740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 755

<210> 3
 <211> 2274
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2274)

10

<400> 3

atg gat gtc aat ccg act cta ctc ttc tta aag gtg cca gcg cag aat	48
Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn	
1 5 10 15	
gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat	96
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His	
20 25 30	
gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa	144
Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln	
35 40 45	
tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca	192
Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro	
50 55 60	
caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agc	240
Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser	
65 70 75 80	
ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa	288
Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu	
85 90 95	
gaa tcc cat cca gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag	336
Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu	
100 105 110	

ES 2 393 406 T3

gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act	384
Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr	
115 120 125	
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa oct gcc gca aca gca ctt gct	432
Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala	
130 135 140	
aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg act tcc aat gaa tcg	480
Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser	
145 150 155 160	
ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag	528
Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys	
165 170 175	
gaa gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga	576
Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg	
180 185 190	
gac aac atg aca aag aga atg gta aca cag aga acc ata ggg aag aaa	624
Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys	
195 200 205	
aaa caa cga tta aac aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta	672
Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu	
210 215 220	
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca	720
Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala	
225 230 235 240	
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga ggg ttt gta tat ttt gtt gaa	768
Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu	
245 250 255	
aca cta gct cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca	816
Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro	
260 265 270	
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa	864
Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys	
275 280 285	
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg	912
Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly	
290 295 300	
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca	960
Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala	
305 310 315 320	
atg atc aca tac ata act aga aac cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt	1008
Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val	
325 330 335	
cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg	1056
Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly	
340 345 350	

aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata	1104
Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile	
355 360 365	
cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca	1152
Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser	
370 375 380	
aca aaa aag aaa att gag aag ata cga cca ctt ctg gtt gac ggg act	1200
Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr	
385 390 395 400	
gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc	1248
Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser	
405 410 415	
act gtg ctg ggt gta tcc ata tta aac ctg ggc cag agg aaa tac aca	1296
Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr	
420 425 430	
aag acc aca tac tgg tgg gat ggt ctg caa tca tcc gat gac ttt gct	1344
Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala	
435 440 445	
ttg ata gtg aat gcg cct aat cat gaa gga gta caa gct gga gta gac	1392
Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Val Gln Ala Gly Val Asp	
450 455 460	
aga ttc tat aga act tgc aaa ctg gtc ggg atc aac atg agc aaa aag	1440
Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys	
465 470 475 480	
aag tcc tac ata aat aga act gga aca ttc gaa ttc aca agc ttt ttc	1488
Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe	
485 490 495	
tac cgg tat ggt ttt gta gcc aat ttc agc atg gaa cta ccc agt ttt	1536
Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe	
500 505 510	
ggg gtt tcc gga ata aat gaa tct gca gac atg agc att gga gtg aca	1584
Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr	
515 520 525	
gtc atc aaa aac aac atg ata aat aat gat ctc ggt cct gcc acg gca	1632
Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala	
530 535 540	
caa atg gca ctc caa ctc ttc att aag gat tat cgg tac aca tac cgg	1680
Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg	
545 550 555 560	
tgc cat aga ggt gat acc cag ata caa acc aga aga tct ttt gag ttg	1728
Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu	
565 570 575	
aag aaa ctg tgg gaa cag act cga tca aag act ggt cta ctg gta tca	1776
Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser	
580 585 590	

gat ggg ggt cca aac cta tat aac atc aga aac cta cac atc ccg gaa 1824
 Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
 595 600 605

gtc tgt tta aaa tgg gag cta atg gat gaa gat tat aag ggg agg cta 1872
 Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610 615 620

tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc 1920
 Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
 625 630 635 640

aac agt gca gta gta atg cct gcg cat ggc cct gcc aaa agc atg gag 1968
 Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655

tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg 2016
 Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670

tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga gta ctc gaa gat gag cag atg 2064
 Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Val Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685

tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca 2112
 Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700

tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gtg tcc 2160
 Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720

agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag 2208
 Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
 725 730 735

aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag 2256
 Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
 740 745 750

ctc aga cgg caa aaa tag 2274
 Leu Arg Arg Gln Lys
 755

<210> 4
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 4

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30

10

ES 2 393 406 T3

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
35 40 45

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
50 55 60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
100 105 110

Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
130 135 140

Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
145 150 155 160

Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
165 170 175

Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
195 200 205

Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
210 215 220

Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
225 230 235 240

Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
245 250 255

Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
260 265 270

ES 2 393 406 T3

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
 275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
 290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
 305 310 315 320

Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 355 360 365

Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
 370 375 380

Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
 405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr
 420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
 435 440 445

Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Val Gln Ala Gly Val Asp
 450 455 460

Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
 465 470 475 480

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510

ES 2 393 406 T3

Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
515 520 525

Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
530 535 540

Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
545 550 555 560

Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu
565 570 575

Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser
580 585 590

Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
595 600 605

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
610 615 620

Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
625 630 635 640

Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
645 650 655

Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
660 665 670

Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Val Leu Glu Asp Glu Gln Met
675 680 685

Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
690 695 700

Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
705 710 715 720

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
725 730 735

Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys
755

ES 2 393 406 T3

5 <210> 5
 <211> 2151
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2151)

<400> 5

```

atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt      48
Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
1                               5                               10                               15

gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca      96
Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
                               20                               25                               30

aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac      144
Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
                               35                               40                               45

tcg gat ttt cac ttt att aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag      192
Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
                               50                               55                               60

tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag      240
Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
65                               70                               75                               80

ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac      288
Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
                               85                               90                               95

acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat      336
Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
                               100                              105                              110

aag gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac      384
Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
                               115                              120                              125

ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat      432
Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
                               130                              135                              140

atc cac att ttc tca ttt aca gga gag gaa atg gct aca aaa gcg gac      480
Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
145                               150                               155                               160

tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc      528
Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
                               165                              170                              175
  
```


acc ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt	576
Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg	
180 185 190	
cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa ata aca	624
Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr	
195 200 205	
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc	672
Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser	
210 215 220	
agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat gtg gat gga ttc gaa ccg aac ggc	720
Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly	
225 230 235 240	
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aga	768
Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg	
245 250 255	
atc gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt	816
Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly	
260 265 270	
ggg cca ccc tgc cat cag cga tct aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg	864
Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu	
275 280 285	
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag gga ata cca cta	912
Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu	
290 295 300	
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc	960
Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro	
305 310 315 320	
agt att gtt aaa cca cat gaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa	1008
Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln	
325 330 335	
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa	1056
Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu	
340 345 350	
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg	1104
Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp	
355 360 365	
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt	1152
Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys	
370 375 380	
aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa gca	1200
Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala	
385 390 395 400	
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aaa gct tgt gag	1248
Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu	
405 410 415	

ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc	1296
Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val	
420 425 430	
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct	1344
Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala	
435 440 445	
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata ata aaa gga gtg tac	1392
Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Ile Lys Gly Val Tyr	
450 455 460	
atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt	1440
Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe	
465 470 475 480	
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg	1488
Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg	
485 490 495	
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga	1536
Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg	
500 505 510	
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act	1584
Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr	
515 520 525	
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa	1632
Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu	
530 535 540	
att gga gac atg ctt cta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc	1680
Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro	
545 550 555 560	
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa	1728
Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys	
565 570 575	
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att	1776
Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile	
580 585 590	
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc	1824
Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr	
595 600 605	
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc	1872
Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser	
610 615 620	
ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta	1920
Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu	
625 630 635 640	
tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa	1968
Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu	
645 650 655	

ES 2 393 406 T3

```

ggg ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt      2016
Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
                660                      665                      670

aag gat gac ctg gaa cct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa      2064
Lys Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
                675                      680                      685

tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca      2112
Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
                690                      695                      700

tct tgg ttc aac tcc ttc ctt aca cat gca ctg aag tag                    2151
Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
                705                      710                      715

```

<210> 6
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 6

```

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1                5                10                15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
                20                25                30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35                40                45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50                55                60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65                70                75                80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85                90                95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100               105               110

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115               120               125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130               135               140

```

10

ES 2 393 406 T3

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
 195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
 210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg
 245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
 260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
 290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
 305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
 325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
 340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
 355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
 370 375 380

ES 2 393 406 T3

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
 405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
 420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Ile Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620

ES 2 393 406 T3

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
660 665 670

Lys Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 7
<211> 838
5 <212> ADN
<213> Virus de la gripe

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(657)

<400> 7

atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg	48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp	
1 5 10 15	
cat gtc cgc aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc	96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe	
20 25 30	
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc	144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser	
35 40 45	
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata	192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile	
50 55 60	
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc	240
Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr	
65 70 75 80	
att gcc tct gtt cct act tca ctc tac tta act gac atg act ctt gat	288
Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Leu Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp	
85 90 95	
gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca	336

ES 2 393 406 T3

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
 100 105 110

ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc 384
 Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125

ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa ggg ctg gaa aca cta 432
 Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
 130 135 140

ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att 480
 Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gag 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

aat ggg aga cct tca ttc cct tca aag cag aaa tgaaaaatgg agagaacaat 677
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Ser Ser Lys Gln Lys
 210 215

taagccagaa atttgaagaa ataagatggt tgattgaaga agtgcgacat agattgaaaa 737

atacagaaaa tagttttgaa caaataacat ttatgcaagc cttacaacta ttgcttgaag 797

tagaacaaga gataagaact ttctcgtttc agcttattta a 838

<210> 8
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 8

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60

10

```

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65                               70                               75                               80

Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Leu Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
                               85                               90                               95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
                               100                              105                              110

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
                               115                              120                              125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
                               130                              135                              140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
145                              150                              155                              160

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
                               165                              170                              175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
                               180                              185                              190

Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
                               195                              200                              205

Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
210                              215

```

5 <210> 9
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1497)

<400> 9

```

atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat      48
Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1                               5                               10                               15

ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg      96
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
                               20                               25                               30

```


ES 2 393 406 T3

gtg gga gga atc ggc cga ttt tat gtt cag atg tgt act gag ctt aaa	144
Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys	
35 40 45	
cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa	192
Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu	
50 55 60	
agg atg gta ctt tcg gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag	240
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu	
65 70 75 80	
gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata	288
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile	
85 90 95	
tac aga agg aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat	336
Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp	
100 105 110	
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac	384
Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp	
115 120 125	
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat	432
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn	
130 135 140	
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat	480
Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp	
145 150 155 160	
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct	528
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser	
165 170 175	
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggt gtt gga aca atg gta atg gaa	576
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu	
180 185 190	
ctc atc aga atg atc aaa cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga	624
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg	
195 200 205	
ggt gaa aat ggt cga aaa acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat	672
Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn	
210 215 220	
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac	720
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp	
225 230 235 240	
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac got gag att gag gat ctc	768
Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu	
245 250 255	
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat	816
Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His	
260 265 270	

ES 2 393 406 T3

aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca ata acc agt ggg	864
Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Ile Thr Ser Gly	
275 280 285	
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc	912
Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe	
290 295 300	
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa	960
Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu	
305 310 315 320	
aac cca gca cac aag agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca	1008
Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala	
325 330 335	
gca ttt gag gac ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta	1056
Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val	
340 345 350	
atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat	1104
Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn	
355 360 365	
gaa aac atg gag aca ata aat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa	1152
Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys	
370 375 380	
tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga	1200
Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg	
385 390 395 400	
gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga	1248
Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg	
405 410 415	
aat cta ecc ttt gag aga gcg acc att atg gct gca ttc act ggt aac	1296
Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn	
420 425 430	
act gaa ggg agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg	1344
Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met	
435 440 445	
gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc	1392
Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe	
450 455 460	
gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac	1440
Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp	
465 470 475 480	
atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt	1488
Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe	
485 490 495	
gac agt taa	1497
Asp Ser	

<210> 10
<211> 498

ES 2 393 406 T3

<212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<400> 10

5

```

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1           5           10           15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
          20           25           30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
          35           40           45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
          50           55           60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
65           70           75           80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
          85           90           95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
          100          105          110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
          115          120          125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
          130          135          140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
145          150          155          160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
          165          170          175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
          180          185          190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
          195          200          205
    
```

Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
 245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Ile Thr Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445

ES 2 393 406 T3

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

Asp Ser

<210> 11
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 11

atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg	48
Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca	96
Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr	
20 25 30	
gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg	144
Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr	
35 40 45	
atc ata aga aag tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa att act caa	192
Ile Ile Arg Lys Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Ile Thr Gln	
50 55 60	
tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa	240
Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu	
65 70 75 80	
tac tac atg aac aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca	288
Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala	
85 90 95	
cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt	336
Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val	
100 105 110	
ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga	384
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg	
115 120 125	
acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac	432

Thr	Phe	Phe	Leu	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Lys	His	Ser	Asn		
	130					135					140						
ggc	aca	gta	aag	gac	cga	agt	ccg	tat	agg	act	ttg	atg	agt	gtc	aaa	480	
Gly	Thr	Val	Lys	Asp	Arg	Ser	Pro	Tyr	Arg	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Lys		
145					150					155					160		
ata	ggg	caa	tca	cct	aat	gta	tat	caa	gct	aga	ttt	gaa	tcg	gta	gca	528	
Ile	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	Val	Tyr	Gln	Ala	Arg	Phe	Glu	Ser	Val	Ala		
				165					170					175			
tgg	tca	gca	aca	gca	tgc	cat	gat	gga	aaa	aaa	tgg	atg	aca	gtt	gga	576	
Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Met	Thr	Val	Gly		
			180					185					190				
gtc	aca	ggg	ccc	gac	aat	caa	gca	att	gca	gta	gtg	aac	tat	gga	ggt	624	
Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Tyr	Gly	Gly		
		195					200					205					
gtt	ccg	gtt	gat	att	att	aat	tca	tgg	gca	ggg	gat	att	tta	aga	acc	672	
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Ser	Trp	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr		
	210					215					220						
caa	gaa	tca	tca	tgc	acc	tgc	att	aaa	gga	gac	tgt	tat	tgg	gta	atg	720	
Gln	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Cys	Ile	Lys	Gly	Asp	Cys	Tyr	Trp	Val	Met		
225					230					235					240		
act	gat	gga	ccg	gca	aat	agg	caa	gct	aaa	tat	agg	ata	ttc	aaa	gca	768	
Thr	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala		
				245					250					255			
aaa	gat	gga	aga	gta	att	gga	cag	act	gat	ata	agt	ttc	aat	ggg	gga	816	
Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	Phe	Asn	Gly	Gly		
			260					265					270				
cac	ata	gag	gag	tgt	tct	tgt	tac	ccc	aat	gaa	ggg	aag	gtg	gaa	tgc	864	
His	Ile	Glu	Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asn	Glu	Gly	Lys	Val	Glu	Cys		
		275					280					285					
ata	tgc	agg	gac	aat	tgg	act	gga	aca	aat	aga	cca	gtt	ctg	gta	ata	912	
Ile	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Val	Leu	Val	Ile		
	290					295					300						
tct	tct	gat	cta	tcg	tac	aca	gtt	gga	tat	ttg	tgt	gct	ggc	att	ccc	960	
Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Pro		
305					310					315					320		
act	gac	act	cct	agg	gga	gag	gat	agt	caa	ttc	aca	ggc	tca	tgt	aca	1008	
Thr	Asp	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser	Gln	Phe	Thr	Gly	Ser	Cys	Thr		
				325					330					335			
agt	cct	ttg	gga	aat	aaa	gga	tac	ggt	gta	aaa	ggt	ttc	ggg	ttt	cga	1056	
Ser	Pro	Leu	Gly	Asn	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Arg		
			340					345					350				
caa	gga	act	gac	gta	tgg	gcc	gga	agg	aca	att	agt	agg	act	tca	aga	1104	
Gln	Gly	Thr	Asp	Val	Trp	Ala	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	Arg		
		355					360					365					
tca	gga	ttc	gaa	ata	ata	aaa	atc	agg	aat	ggt	tgg	aca	cag	aac	agt	1152	

```

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370                               375                               380

aaa gac caa atc agg agg caa gtg att atc gat gac cca aat tgg tca      1200
Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
385                               390                               395                               400

gga tat agc ggt tct ttc aca ttg ccg gtt gaa cta aca aaa aag gga      1248
Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
                               405                               410                               415

tgt ttg gtc ccc tgt ttc tgg gtt gaa atg att aga ggt aaa cct gaa      1296
Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
                               420                               425                               430

gaa aca aca ata tgg acc tct agt agc tcc att gtg atg tgt gga gta      1344
Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
                               435                               440                               445

gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc      1392
Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
                               450                               455                               460

ttt gac atc gat aag atg taa                                          1413
Phe Asp Ile Asp Lys Met
465                               470

```

<210> 12
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

 <400> 12

5

```

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1                               5                               10                               15

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
                               20                               25                               30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
                               35                               40                               45

Ile Ile Arg Lys Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Ile Thr Gln
 50                               55                               60

Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
65                               70                               75                               80

Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
                               85                               90                               95

Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val

```

10

ES 2 393 406 T3

```

                340                345                350

Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
      355                360                365

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
      370                375                380

Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
      385                390                395                400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
      405                410                415

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
      420                425                430

Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
      435                440                445

Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
      450                455                460

Phe Asp Ile Asp Lys Met
      465                470

```

5 <210> 13
 <211> 982
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (756)

<400> 13

```

atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca      48
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
1                5                10                15

tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt      96
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
                20                25                30

gca gga aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca      144
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
                35                40                45

aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc      192
Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe

```

ES 2 393 406 T3

50	55	60	
acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc			240
Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val			
65	70	75	80
caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca			288
Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala			
	85	90	95
gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca			336
Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala			
	100	105	110
aaa gag gta gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg			384
Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met			
	115	120	125
gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt			432
Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe			
	130	135	140
ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga			480
Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg			
145	150	155	160
gct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca ttg atc aga cat gaa			528
Ala His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu			
	165	170	175
aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg			576
Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met			
	180	185	190
gca gga tcg agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg			624
Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg			
	195	200	205
gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc			672
Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser			
	210	215	220
tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac			720
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr			
225	230	235	240
cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc			768
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys			
	245	250	
gttattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt			826
ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa			886
ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt			946
gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagtaa			982

<210> 14
 <211> 252
 <212> PRT

ES 2 393 406 T3

<213> Virus de la gripe

<400> 14

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
 65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
 100 105 110

Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
 130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
 145 150 155 160

Ala His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
 165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg
 195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
 210 215 220

ES 2 393 406 T3

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

<210> 15
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 15

atg aag aca acc att att ttg ata cta cta acc cat tgg gcc tac agt 48
 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

caa aac cca atc agt ggc aac aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac 96
 Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca atg agt gat gat caa 144
 His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45

att gag gtg aca aat got aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg 192
 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60

aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca 240
 Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80

tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat 288
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95

gag agt tgg gac ctc ttc ata gaa aga agc aac got ttc agc aat tgc 336
 Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110

tac cca tat gac atc cct gac tat gca tcg ctc cga tcc att gta gca 384
 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125

tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt 432
 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140

gtc act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat 480
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160

agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg cta aca aaa tct gga agc tct tac	528
Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr	
165 170 175	
ccc aca ttg aat gtg aca atg cct aac aat aaa aat ttc gac aag cta	576
Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu	
180 185 190	
tac atc tgg ggg att cat cac ccg agc tca aat caa gag cag aca aaa	624
Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys	
195 200 205	
ttg tac atc caa gaa tca gga cga gta aca gtc tca aca aaa aga agt	672
Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser	
210 215 220	
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tct aga ccg ttg gtc aga ggt	720
Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly	
225 230 235 240	
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat	768
Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp	
245 250 255	
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat	816
Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr	
260 265 270	
ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc tct gta atg aga tca gat gca ccc	864
Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro	
275 280 285	
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc	912
Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser	
290 295 300	
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc	960
Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys	
305 310 315 320	
cct aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg	1008
Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg	
325 330 335	
aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga	1056
Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly	
340 345 350	
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc	1104
Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe	
355 360 365	
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc	1152
Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser	
370 375 380	
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att	1200
Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile	
385 390 395 400	

ES 2 393 406 T3

gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa 1248
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

gta gaa gga aga att cag gac ctg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa 1296
 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat 1344
 Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag 1392
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga 1440
 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gga tca ata 1488
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495

aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aga gat gaa gca tta aac 1536
 Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

aac cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat 1584
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

tgg ata ttg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 1632
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aga ggc aac atc aga 1680
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

tgc aac att tgc att tga 1698
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 16
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 16

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

10

ES 2 393 406 T3

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45
 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60
 Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95
 Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110
 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125
 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160
 Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175
 Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 180 185 190
 Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 195 200 205
 Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 210 215 220
 Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 225 230 235 240
 Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255
 Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 260 265 270

Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro
 275 280 285

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 355 360 365

Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
 565

5 <210> 17
 <211> 2277
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2277)

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (731)..(731)

<223> El 'Xaa' en posición 731 representa Val o Ile

<400> 17

atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc 48
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15

cgc gag ata cta aca aaa act act gtg gac cac atg gcc ata atc aag 96
 Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

aaa tac aca tca gga aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa 144
 Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45

tgg atg atg gca atg aaa tac cca att aca gca gat aag agg ata atg 192
 Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60

gag atg att cct gag aga aat gaa cag gga caa acc ctt tgg agc aaa 240
 Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65 70 75 80

acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg 288
 Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
 85 90 95

aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg agc aca att cat tat cca 336
 Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro
 100 105 110

20

aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga	384
Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly	
115 120 125	
acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga	432
Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg	
130 135 140	
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac ctc agt gcc aaa gaa gca caa	480
Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln	
145 150 155 160	
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc aga att	528
Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile	
165 170 175	
cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa	576
Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu	
180 185 190	
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa	624
Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu	
195 200 205	
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gca ggc gga aca	672
Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr	
210 215 220	
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg	720
Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp	
225 230 235 240	
gag caa atg tac acc cca gga gga gaa gtt aga aac gat gat att gat	768
Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp	
245 250 255	
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gcg aca gta	816
Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val	
260 265 270	
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag	864
Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln	
275 280 285	
att ggt gga ata agg atg gta gac atc ctt aag cag aat cca aca gag	912
Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu	
290 295 300	
gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca gca atg gga ttg aga att agc	960
Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser	
305 310 315 320	
tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc ttc aaa aga aca agt gga tca	1008
Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser	
325 330 335	
tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt acg ggc aac ctt caa aca ttg	1056
Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu	
340 345 350	

ES 2 393 406 T3

aaa ata aga gtg cat gag ggc tat gaa gaa ttc aca atg gtc gga aga	1104
Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg	
355 360 365	
aga gca aca gcc att atc aga aag gca acc aga aga ttg att caa ttg	1152
Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu	
370 375 380	
ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca att gct gaa gca ata att gta	1200
Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val	
385 390 395 400	
gcc atg gtg ttt tgc caa gaa gat tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc	1248
Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly	
405 410 415	
gat ttg aac ttt gtt aat aga gca aat cag cgt ttg aac ccc atg cat	1296
Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His	
420 425 430	
caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc caa aat	1344
Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn	
435 440 445	
tgg gga att gaa ccc atc gac aat gta atg ggg atg att gga ata ttg	1392
Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu	
450 455 460	
cct gac atg acc cca agc acc gag atg tca ttg aga gga gtg aga gtc	1440
Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val	
465 470 475 480	
agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc agc act gag aga gtg gtg gtg	1488
Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val	
485 490 495	
agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg gat caa agg gga aac ata cta	1536
Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu	
500 505 510	
ctg tcc cct gaa gaa gtc agt gaa aca caa gga acg gaa aag ctg aca	1584
Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr	
515 520 525	
ata att tat tgc tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca	1632
Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser	
530 535 540	
gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc agg aac tgg gaa att gta	1680
Val Leu Val Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val	
545 550 555 560	
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa	1728
Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu	
565 570 575	
ttt gag cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac	1776
Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr	
580 585 590	

ES 2 393 406 T3

```

agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga      1824
Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
      595                                600                                605

aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct      1872
Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
      610                                615                                620

cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta      1920
Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
      625                                630                                635                                640

aga ggt tcg gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc      1968
Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
      645                                650                                655

aac tac aat aaa gcc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca      2016
Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
      660                                665                                670

ggt gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gaa tct      2064
Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
      675                                680                                685

gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gaa aac aag aga tat      2112
Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
      690                                695                                700

ggc cca gca cta agc atc aat gaa cta agc aaa ctt gca aaa ggg gag      2160
Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
      705                                710                                715                                720

aaa gcc aat gta cta att ggg caa ggg gac rta gtg ttg gta atg aaa      2208
Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Xaa Val Leu Val Met Lys
      725                                730                                735

cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act gac agc cag aca gcg acc aaa      2256
Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
      740                                745                                750

agg att cgg atg gcc atc aat      2277
Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
      755

```

<210> 18
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (731)..(731)
 <223> El 'Xaa' en posición 731 representa Val o Ile.

<400> 18

```

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
1          5          10          15

```

5

10

15

ES 2 393 406 T3

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
 85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro
 100 105 110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
 115 120 125

Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
 130 135 140

Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
 145 150 155 160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile
 165 170 175

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr
 210 215 220

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
 245 250 255

ES 2 393 406 T3

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
 260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285

Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
 435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
 450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
 465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
 485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr
580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Xaa Val Leu Val Met Lys
725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
 740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 755

5 <210> 19
 <211> 2274
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2274)

<400> 19

```

atg gat gtc aat ccg act cta ctt ttc tta aag gtg cca gcg caa aat      48
Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
1          5          10          15

gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat      96
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
          20          25          30

gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa      144
Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
          35          40          45

tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca      192
Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
          50          55          60

caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt      240
Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
65          70          75          80

ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa      288
Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
          85          90          95

gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag      336
Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
          100          105          110

gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act      384
Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
          115          120          125

tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct      432
Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
          130          135          140

aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg act tcc aat gaa tcg      480
Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
145          150          155          160
    
```


ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag 528
 Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
 165 170 175

gaa gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga 576
 Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
 180 185 190

gac aac atg aca aag aga atg gta aca cag aga acc ata ggg aag aaa 624
 Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
 195 200 205

aaa caa cga tta aac aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta 672
 Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
 210 215 220

aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca 720
 Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
 225 230 235 240

atc gct acc cca ggg atg cag ata aga ggg ttt gta tat ttt gtt gaa 768
 Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
 245 250 255

aca cta gcc cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca 816
 Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
 260 265 270

gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa 864
 Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
 275 280 285

atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg 912
 Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
 290 295 300

gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca 960
 Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
 305 310 315 320

atg atc aca tac ata act aga aac cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt 1008
 Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
 325 330 335

cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg 1056
 Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata 1104
 Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 355 360 365

cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca 1152
 Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
 370 375 380

aca aaa aag aaa att gaa aag ata cga cca ctt ctg gtt gac ggg act 1200
 Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
 385 390 395 400

ES 2 393 406 T3

gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc	1248
Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser	
405 410 415	
act gtg ctg ggt gta tcc ata tta aac ctg ggc cag agg aaa tac aca	1296
Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr	
420 425 430	
aag acc aca tac tgg tgg gat ggt ctg caa tca tcc gat gac ttt gct	1344
Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala	
435 440 445	
ttg ata gtg aat gcg cct aat cat gaa gga ata caa gct gga gta gac	1392
Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp	
450 455 460	
aga ttc tat aga act tgc aaa ctg gtc ggg atc aac atg agc aaa aag	1440
Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys	
465 470 475 480	
aaa tcc tac ata aat aga act gga aca ttc gaa ttc aca agc ttt ttc	1488
Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe	
485 490 495	
tac cgg tat ggt ttt gta gcc aat ttc agc atg gaa cta ccc agt ttt	1536
Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe	
500 505 510	
ggg gtt tcc gga ata aat gaa tct gca gac atg agc att gga gtg aca	1584
Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr	
515 520 525	
gtc atc aaa aac aac atg ata aat aat gat ctc ggt cct gcc acg gca	1632
Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala	
530 535 540	
caa atg gca ctc caa ctc ttc att aag gat tat cgg tac aca tac cgg	1680
Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg	
545 550 555 560	
tgc cat aga ggt gat acc cag ata caa acc aga aga tct ttt gag ttg	1728
Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu	
565 570 575	
aag aaa ctg tgg gaa cag act cga tca aag act ggt cta ctg gta tca	1776
Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser	
580 585 590	
gat ggg ggt cca aac cta tat aac atc aga aac cta cac atc ccg gaa	1824
Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu	
595 600 605	
gtc tgt tta aaa tgg gag cta atg gat gaa gat tat aag ggg agg cta	1872
Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu	
610 615 620	
tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc	1920
Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val	
625 630 635 640	

ES 2 393 406 T3

```

aac agt gca gta gta atg cct gcg cat ggc cct gcc aaa agc atg gag      1968
Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
                    645                                650                    655

tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg      2016
Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
                    660                                665                    670

tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga ata ctc gaa gat gag cag atg      2064
Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
                    675                                680                    685

tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca      2112
Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
                    690                                695                                700

tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gtg tcc      2160
Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
                    705                                710                                715                                720

agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag      2208
Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
                    725                                730                                735

aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag      2256
Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
                    740                                745                                750

ctc aga cgg caa aaa tag                                          2274
Leu Arg Arg Gln Lys
                    755

```

<210> 20
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

 <400> 20

```

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
1                    5                                10                    15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
                20                                25                    30

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
                35                                40                    45

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
                50                                55                    60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
65                                70                                75                    80

```

5

10

ES 2 393 406 T3

Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
100 105 110

Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
130 135 140

Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
145 150 155 160

Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
165 170 175

Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
195 200 205

Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
210 215 220

Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
225 230 235 240

Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
245 250 255

Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
260 265 270

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
305 310 315 320

ES 2 393 406 T3

Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 355 360 365

Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
 370 375 380

Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
 405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr
 420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
 435 440 445

Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp
 450 455 460

Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
 465 470 475 480

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510

Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
 515 520 525

Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
 530 535 540

Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
 545 550 555 560

Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu
565 570 575

Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser
580 585 590

Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
595 600 605

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
610 615 620

Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
625 630 635 640

Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
645 650 655

Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
660 665 670

Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
675 680 685

Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
690 695 700

Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
705 710 715 720

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
725 730 735

Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys
755

- <210> 21
- <211> 2151
- 5 <212> ADN
- <213> Virus de la gripe

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(2151)

- <400> 21

ES 2 393 406 T3

atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt	48
Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu	
1 5 10 15	
gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca	96
Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr	
20 25 30	
aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac	144
Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr	
35 40 45	
tcg gat ttt cac ttt att aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag	192
Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu	
50 55 60	
tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag	240
Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu	
65 70 75 80	
ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac	288
Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn	
85 90 95	
acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat	336
Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr	
100 105 110	
aag gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac	384
Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His	
115 120 125	
ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat	432
Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His	
130 135 140	
atc cac att ttc tca ttt aca gga gag gaa atg gct aca aaa gcg gac	480
Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp	
145 150 155 160	
tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc	528
Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe	
165 170 175	
act ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt	576
Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg	
180 185 190	
cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa atc aca	624
Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr	
195 200 205	
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc	672
Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser	
210 215 220	

agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat gtg gat gga ttc gaa ccg aac ggc	720
Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly	
225 230 235 240	
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aga	768
Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg	
245 250 255	
atc gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt	816
Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly	
260 265 270	
ggg cca ccc tgc cat cag cga tct aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg	864
Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu	
275 280 285	
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag gga ata cca cta	912
Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu	
290 295 300	
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc	960
Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro	
305 310 315 320	
agt att gtt aaa cca cat gaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa	1008
Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln	
325 330 335	
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa	1056
Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu	
340 345 350	
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg	1104
Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp	
355 360 365	
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt	1152
Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys	
370 375 380	
aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa aca	1200
Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Thr	
385 390 395 400	
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aaa gct tgt gag	1248
Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu	
405 410 415	
ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc	1296
Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val	
420 425 430	
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct	1344
Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala	
435 440 445	
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata atg aaa gga gtg tac	1392
Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr	
450 455 460	

ES 2 393 406 T3

atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe 465 470 475 480	1440
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg 485 490 495	1488
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg 500 505 510	1536
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr 515 520 525	1584
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu 530 535 540	1632
att gga gac atg ctt cta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro 545 550 555 560	1680
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys 565 570 575	1728
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile 580 585 590	1776
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr 595 600 605	1824
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser 610 615 620	1872
ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu 625 630 635 640	1920
tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu 645 650 655	1968
ggg ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu 660 665 670	2016
agg gat gac ctg gaa oct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu 675 680 685	2064
tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala 690 695 700	2112

tct tgg ttc aac tcc ttc ctt aca cat gca ctg aag tag 2151
 Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

5

<210> 22
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 22

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190

10

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
 195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
 210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg
 245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
 260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
 290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
 305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
 325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
 340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
 355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
 370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Thr
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
 405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
 420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

ES 2 393 406 T3

Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 23
<211> 838
5 <212> ADN
<213> Virus de la gripe

<220>
10 <221> CDS
<222> (1).. (657)

<400> 23

atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg	48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp	
1 5 10 15	
cat gtc cgc aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc	96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe	
20 25 30	
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc	144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser	
35 40 45	
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata	192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile	
50 55 60	
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc	240
Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr	
65 70 75 80	
att gcc tct gtt cct act tca cgc tac tta act gac atg act ctt gat	288
Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp	
85 90 95	
gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca	336
Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr	
100 105 110	
ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc	384
Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile	
115 120 125	
ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa ggg ctg gaa aca cta	432
Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu	
130 135 140	
ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att	480

ES 2 393 406 T3

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gag 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

aat ggg aga cct tca ttc cct tca aag cag aaa tgaaaaatgg agagaacaat 677
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
 210 215

taagccagaa atttgaagaa ataagatggt tgattgaaga agtgcgacat agattgaaaa 737

atacagaaaa tagttttgaa caaataacat ttatgcaagc cttacaacta ttgcttgaag 797

tagaacaaga gataagaact ttctcgtttc agcttattta a 838

<210> 24
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 24

5

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80

Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
 85 90 95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
 100 105 110

10

ES 2 393 406 T3

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
 130 135 140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
 210 215

<210> 25
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1497)

10

<400> 25

atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat 48
 Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg 96
 Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

gtg gga gga atc ggc cgg ttt tat gtt cag atg tgt act gag ctt aaa 144
 Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa 192
 Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

agg atg gta ctt tcg gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag 240
 Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata	288
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile	
85 90 95	
tac aga agg aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat	336
Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp	
100 105 110	
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac	384
Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp	
115 120 125	
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat	432
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn	
130 135 140	
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat	480
Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp	
145 150 155 160	
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct	528
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser	
165 170 175	
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggt gtt gga aca atg gta atg gaa	576
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu	
180 185 190	
ctc atc aga atg atc aaa cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga	624
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg	
195 200 205	
ggt gaa aat ggt cga aga acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat	672
Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn	
210 215 220	
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac	720
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp	
225 230 235 240	
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc	768
Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu	
245 250 255	
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat	816
Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His	
260 265 270	
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca gta acc agt ggg	864
Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly	
275 280 285	
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc	912
Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe	
290 295 300	
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa	960
Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu	
305 310 315 320	

ES 2 393 406 T3

```

aac cca gca cac aag agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca      1008
Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
                325                      330                      335

gca ttt gag gac ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta      1056
Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
                340                      345                      350

atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat      1104
Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
                355                      360                      365

gaa aac atg gag aca ata gat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa      1152
Glu Asn Met Glu Thr Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
                370                      375                      380

tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga      1200
Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
                385                      390                      395                      400

gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga      1248
Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
                405                      410                      415

aat ctt ccc ttt gag aga gca acc att atg gct gca ttc act ggt aac      1296
Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
                420                      425                      430

act gaa ggg agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg      1344
Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
                435                      440                      445

gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc      1392
Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
                450                      455                      460

gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac      1440
Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
                465                      470                      475                      480

atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt      1488
Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
                485                      490                      495

gac agt taa      1497
Asp Ser

```

<210> 26
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

 <400> 26

```

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1          5          10          15

```

5

10

ES 2 393 406 T3

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
 245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

Asp Ser

ES 2 393 406 T3

<210> 27
 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)

10

<400> 27

```

atg aat cca aat caa aag ata ata aca att gga ttt gca tca ttg ggg      48
Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
1                               5                               10                               15

ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca      96
Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
                               20                               25                               30

gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg      144
Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
                               35                               40                               45

atc ata aga gag tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa att act caa      192
Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Ile Thr Gln
                               50                               55                               60

tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa      240
Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
65                               70                               75                               80

tac tac atg aac aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca      288
Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
                               85                               90                               95

cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt      336
Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
                               100                              105                              110

ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga      384
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg
                               115                              120                              125

acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac      432
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
                               130                              135                              140

ggc aca gta aag gac cga agt ccg tat agg act ttg atg agt gtc aaa      480
Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys
145                              150                              155                              160

ata ggg caa tca cct aat gta tat caa gct agg ttt gaa tcg gtg gca      528
Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala
                               165                              170                              175

tgg tca gca aca gca tgc cat gat gga aaa aaa tgg atg aca gtt gga      576
    
```

ES 2 393 406 T3

Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Met	Thr	Val	Gly		
			180					185					190				
gtc	aca	ggg	ccc	gac	aat	caa	gca	att	gca	gta	gtg	aac	tat	gga	ggt	624	
Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Tyr	Gly	Gly		
		195					200					205					
gtt	ccg	gtt	gat	att	att	aat	tca	tgg	gca	ggg	gat	att	tta	aga	acc	672	
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Ser	Trp	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr		
	210					215					220						
caa	gaa	tca	tca	tgc	acc	tgc	att	aaa	gga	gac	tgt	tat	tgg	gta	atg	720	
Gln	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Cys	Ile	Lys	Gly	Asp	Cys	Tyr	Trp	Val	Met		
225					230					235					240		
act	gat	gga	ccg	gca	aat	agg	caa	gct	aaa	tat	agg	ata	ttc	aaa	gca	768	
Thr	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala		
				245					250					255			
aaa	gat	gga	aga	gta	att	gga	cag	act	gat	ata	agt	ttc	aat	ggg	gga	816	
Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	Phe	Asn	Gly	Gly		
			260					265					270				
cac	ata	gag	gag	tgt	tct	tgt	tac	ccc	aat	gaa	ggg	aag	gtg	gaa	tgc	864	
His	Ile	Glu	Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asn	Glu	Gly	Lys	Val	Glu	Cys		
		275					280					285					
ata	tgc	agg	gac	aat	tgg	act	gga	aca	aat	aga	cca	att	ctg	gta	ata	912	
Ile	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Ile	Leu	Val	Ile		
	290					295					300						
tct	tct	gat	cta	tcg	tac	aca	gtt	gga	tat	ttg	tgt	gct	ggc	att	ccc	960	
Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Pro		
305					310					315				320			
act	gac	act	cct	agg	gga	gag	gat	agt	caa	ttc	aca	ggc	tca	tgt	aca	1008	
Thr	Asp	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser	Gln	Phe	Thr	Gly	Ser	Cys	Thr		
				325					330					335			
agt	cct	ttg	gga	aat	aaa	gga	tac	ggt	gta	aaa	ggt	ttc	ggg	ttt	cga	1056	
Ser	Pro	Leu	Gly	Asn	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Arg		
			340					345					350				
caa	gga	act	gac	gta	tgg	gcc	gga	agg	aca	att	agt	agg	act	tca	aga	1104	
Gln	Gly	Thr	Asp	Val	Trp	Ala	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	Arg		
			355				360						365				
tca	gga	ttc	gaa	ata	ata	aaa	atc	agg	aat	ggt	tgg	aca	cag	aac	agt	1152	
Ser	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Trp	Thr	Gln	Asn	Ser		
	370					375					380						
aaa	gac	caa	atc	agg	agg	caa	gtg	att	atc	gat	gac	cca	aat	tgg	tca	1200	
Lys	Asp	Gln	Ile	Arg	Arg	Gln	Val	Ile	Ile	Asp	Asp	Pro	Asn	Trp	Ser		
385					390					395				400			
gga	tat	agc	ggt	tct	ttc	aca	ttg	ccg	ggt	gaa	cta	aca	aaa	aag	gga	1248	
Gly	Tyr	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly		
				405					410				415				
tgt	ttg	gtc	ccc	tgt	ttc	tgg	ggt	gaa	atg	att	aga	ggt	aaa	cct	gaa	1296	

ES 2 393 406 T3

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430
 gaa aca aca ata tgg acc tct agc agc tcc att gtg atg tgt gga gta 1344
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445
 gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ott ccc 1392
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460
 ttt gac atc gat aag atg 1410
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 28
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 28

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30
 Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45
 Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Ile Thr Gln
 50 55 60
 Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85 90 95
 Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
 100 105 110
 Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg
 115 120 125
 Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
 130 135 140
 Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys

10

ES 2 393 406 T3

```

385              390              395              400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
              405              410              415

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
              420              425              430

Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
              435              440              445

Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
              450              455              460

Phe Asp Ile Asp Lys Met
465              470
    
```

5 <210> 29
 <211> 982
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (756)

<400> 29

```

atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca      48
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
1              5              10              15

tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt      96
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
              20              25              30

gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca      144
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
              35              40              45

aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc      192
Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50              55              60

acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc      240
Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65              70              75              80

caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca      288
Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
              85              90              95

gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca      336
Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
    
```


ES 2 393 406 T3

	100		105		110	
	aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg					384
	Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met					
	115		120		125	
	gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt					432
	Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe					
	130		135		140	
	ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga					480
	Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg					
	145		150		155	160
	tct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca tta atc aga cat gaa					528
	Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu					
		165		170		175
	aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg					576
	Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met					
		180		185		190
	gca gga tcg agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg					624
	Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg					
		195		200		205
	gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc					672
	Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser					
		210		215		220
	tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac					720
	Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr					
		225		230		235
	cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc					766
	Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys					
		245		250		
	ggtattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt					826
	ttottcaaat tcatttatog tgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa					886
	ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt					946
	gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagtaa					982

<210> 30
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 30

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30

10

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
 65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
 100 105 110

Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
 130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
 145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
 165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg
 195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
 210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

<210> 31
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe
 <220>

ES 2 393 406 T3

<221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 31

5

atg aag aca acc att att ttg ata cta ctg acc cat tgg gcc tac agt	48
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser	
1 5 10 15	
caa aac cca atc agt gac aac aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac	96
Gln Asn Pro Ile Ser Asp Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His	
20 25 30	
cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca ata agt gat gat caa	144
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Ser Asp Asp Gln	
35 40 45	
att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg	192
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly	
50 55 60	
aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca	240
Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr	
65 70 75 80	
tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat	288
Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr	
85 90 95	
gag agt tgg gac ctc ttt ata gaa aga agc agc gct ttc agc aat tgc	336
Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys	
100 105 110	
tac cca tat gac atc cct gac tat gca tgg ctc cga tcc att gta gca	384
Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala	
115 120 125	
tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt	432
Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly	
130 135 140	
gtc act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat	480
Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp	
145 150 155 160	
agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg cta aca aaa tct gga agc tct tac	528
Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr	
165 170 175	
ccc aca ttg aat gtg aca atg cct aac aat aaa aat ttc gac aag cta	576
Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu	
180 185 190	
tac atc tgg ggg att cat cac ccg agc tca aat caa gag cag aca aaa	624
Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys	
195 200 205	

ES 2 393 406 T3

ttg tac atc caa gaa tca gga cga gta aca gtc tca aca aaa aga agt	672
Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser	
210 215 220	
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tot aga ccg ttg gtc aga ggt	720
Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly	
225 230 235 240	
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat	768
Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp	
245 250 255	
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat	816
Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr	
260 265 270	
ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc tct gta atg aga tca gat gta ccc	864
Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro	
275 280 285	
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc	912
Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser	
290 295 300	
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc	960
Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys	
305 310 315 320	
ccc aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg	1008
Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg	
325 330 335	
aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga	1056
Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly	
340 345 350	
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc	1104
Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe	
355 360 365	
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc	1152
Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser	
370 375 380	
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att	1200
Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile	
385 390 395 400	
gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa	1248
Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu	
405 410 415	
gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa	1296
Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys	
420 425 430	
ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat	1344
Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn	
435 440 445	

caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag 1392
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

 aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga 1440
 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

 tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gga tca ata 1488
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495

 aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aga gat gaa gca tta aac 1536
 Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

 aac cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat 1584
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

 tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 1632
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

 gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aaa ggc aac atc aga 1680
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

 tgc aac att tgc att tga 1698
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 32
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 32

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

 Gln Asn Pro Ile Ser Asp Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

 His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Ser Asp Asp Gln
 35 40 45

 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60

 Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80

10

ES 2 393 406 T3

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95
 Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110
 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125
 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160
 Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175
 Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 180 185 190
 Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 195 200 205
 Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 210 215 220
 Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 225 230 235 240
 Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255
 Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 260 265 270
 Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro
 275 280 285
 Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300
 Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 355 360 365

Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
 565

ES 2 393 406 T3

<210> 33
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 33

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 1 5 10 15
 His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 20 25 30
 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 35 40 45
 Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 50 55 60
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 65 70 75 80
 Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys
 85 90 95
 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 100 105 110
 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 115 120 125
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 130 135 140
 Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 145 150 155 160
 Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 165 170 175
 Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 180 185 190

ES 2 393 406 T3

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 195 200 205

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 210 215 220

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 225 230 235 240

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 245 250 255

Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro
 260 265 270

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 275 280 285

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 290 295 300

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 305 310 315 320

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 325 330 335

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 340 345 350

Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 355 360 365

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 370 375 380

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 385 390 395 400

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 405 410 415

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 420 425 430

ES 2 393 406 T3

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 435 440 445

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 450 455 460

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 465 470 475 480

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 485 490 495

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 500 505 510

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 515 520 525

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg
 530 535 540

Cys Asn Ile Cys Ile
 545

<210> 34
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 34

Gln Asn Pro Ile Ser Asp Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 1 5 10 15

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Ser Asp Asp Gln
 20 25 30

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 35 40 45

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 50 55 60

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 65 70 75 80

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys

10

ES 2 393 406 T3

	<400> 35 gagagtgg	9	
5	<210> 36 <211> 9 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
10	<400> 36 ccgttggtc	9	
15	<210> 37 <211> 9 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
20	<400> 37 caaaccaga	9	
25	<210> 38 <211> 9 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
30	<400> 38 agaactggg	9	
35	<210> 39 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
40	<400> 39 tatgagagtt gggac	15	
45	<210> 40 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
50	<400> 40 agaccgttg tcaga	15	
55	<210> 41 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
60	<400> 41 aagcaaacca gagga	15	
65	<210> 42 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
	<400> 42 ataagaactg ggaca	15	
	<210> 43 <211> 9 <212> ADN <213> Virus de la gripe		
	<400> 43 acaatgagt	9	

ES 2 393 406 T3

5 <210> 44
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<400> 44
 aaaacaatga gtgat 15

10 <210> 45
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

15 <400> 45
 gatgtaccc 9

20 <210> 46
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

25 <400> 46
 tcagatgtac ccata 15

30 <210> 47
 <211> 2280
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2280)

35 <400> 47

atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc 48
Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr

ES 2 393 406 T3

1	5	10	15	
cgc gag ata cta	aca aaa act act	gtg gac cac atg	gcc ata atc aag	96
Arg Glu Ile Leu	Thr Lys Thr Thr	Val Asp His Met	Ala Ile Ile Lys	
	20	25	30	
aaa tac aca tca	gga aga caa gag	aag aac cct gca	ctt agg atg aaa	144
Lys Tyr Thr Ser	Gly Arg Gln Glu	Lys Asn Pro Ala	Leu Arg Met Lys	
	35	40	45	
tgg atg atg gca	atg aaa tac cca	att aca gca gat	aag agg ata atg	192
Trp Met Met Ala	Met Lys Tyr Pro	Ile Thr Ala Asp	Lys Arg Ile Met	
	50	55	60	
gag atg att cct	gag aga aat gaa	cag gga caa acc	ctt tgg agc aaa	240
Glu Met Ile Pro	Glu Arg Asn Glu	Gln Gly Gln Thr	Leu Trp Ser Lys	
65	70	75	80	
acg aac gat gct	ggc tca gac cgc	gta atg gta tca	cct ctg gca gtg	288
Thr Asn Asp Ala	Gly Ser Asp Arg	Val Met Val Ser	Pro Leu Ala Val	
	85	90	95	
aca tgg tgg aat	agg aat gga cca	aca acg aac aca	att cat tat cca	336
Thr Trp Trp Asn	Arg Asn Gly Pro	Thr Thr Asn Thr	Ile His Tyr Pro	
	100	105	110	
aaa gtc tac aaa	act tat ttt gaa	aag gtt gaa aga	ttg aaa cac gga	384
Lys Val Tyr Lys	Thr Tyr Phe Glu	Lys Val Glu Arg	Leu Lys His Gly	
	115	120	125	
acc ttt ggc ecc	gtt cat ttt agg	aat caa gtc aag	ata aga cga aga	432
Thr Phe Gly Pro	Val His Phe Arg	Asn Gln Val Lys	Ile Arg Arg Arg	
	130	135	140	
gtt gat gta aac	cct ggt cac gcg	gac ctc agt gct	aaa gaa gca caa	480
Val Asp Val Asn	Pro Gly His Ala	Asp Leu Ser Ala	Lys Glu Ala Gln	
145	150	155	160	
gat gtg atc atg	gaa gtt gtt ttc	cca aat gaa gtg	gga gcc aga att	528
Asp Val Ile Met	Glu Val Val Phe	Pro Asn Glu Val	Gly Ala Arg Ile	
	165	170	175	
cta aca tca gaa	tca caa cta aca	ata acc aaa gag	aaa aag gaa gaa	576
Leu Thr Ser Glu	Ser Gln Leu Thr	Ile Thr Lys Glu	Lys Lys Glu Glu	
	180	185	190	
ctt cag gac tgc	aaa att gct ccc	ttg atg gta gca	tac atg cta gaa	624
Leu Gln Asp Cys	Lys Ile Ala Pro	Leu Met Val Ala	Tyr Met Leu Glu	
	195	200	205	
aga gag ttg gtc	cga aaa aca agg	ttc ctc cca gta	gta ggc gga aca	672
Arg Glu Leu Val	Arg Lys Thr Arg	Phe Leu Pro Val	Val Val Gly Gly Thr	
	210	215	220	
agc agt gta tac	att gaa gtg ttg	cat ctg act cag	gga aca tgc tgg	720
Ser Ser Val Tyr	Ile Glu Val Leu	His Leu Thr Gln	Gly Thr Cys Trp	
225	230	235	240	
gag caa atg tac	acc cca gga gga	aaa gtt aga aac	gat gat att gat	768
Glu Gln Met Tyr	Thr Pro Gly Gly	Lys Val Arg Asn	Asp Asp Ile Asp	

ES 2 393 406 T3

				245					250					255		
caa	agt	tta	att	att	gca	gcc	cgg	aac	ata	gtg	aga	aga	gca	aca	gta	816
Gln	Ser	Leu	Ile	Ile	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Val	Arg	Arg	Ala	Thr	Val	
				260					265					270		
tca	gca	gat	cca	cta	gca	tcc	cta	ctg	gaa	atg	tgc	cac	agt	aca	cag	864
Ser	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Met	Cys	His	Ser	Thr	Gln	
				275					280					285		
att	ggt	gga	aca	agg	atg	gta	gac	atc	ctt	aag	cag	aac	cca	aca	gag	912
Ile	Gly	Gly	Thr	Arg	Met	Val	Asp	Ile	Leu	Lys	Gln	Asn	Pro	Thr	Glu	
				290					295					300		
gaa	caa	gct	gtg	gat	ata	tgc	aaa	gca	gca	atg	gga	ttg	aga	att	agc	960
Glu	Gln	Ala	Val	Asp	Ile	Cys	Lys	Ala	Ala	Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Ser	
				305					310					315	320	
tca	tca	ttc	agc	ttt	ggt	gga	ttc	acc	ttc	aaa	agg	aca	agt	gga	tca	1008
Ser	Ser	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Phe	Thr	Phe	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Ser	
				325					330					335		
tca	gtc	aag	aga	gaa	gaa	gaa	atg	ctt	acg	ggc	aac	ctt	caa	aca	ttg	1056
Ser	Val	Lys	Arg	Glu	Glu	Glu	Met	Leu	Thr	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Leu	
				340					345					350		
aaa	ata	aga	gtg	cat	gag	ggc	tat	gaa	gaa	ttc	aca	atg	gtc	gga	aga	1104
Lys	Ile	Arg	Val	His	Glu	Gly	Tyr	Glu	Glu	Phe	Thr	Met	Val	Gly	Arg	
				355					360					365		
aga	gca	aca	gcc	att	atc	aga	aag	gca	acc	aga	aga	ttg	att	caa	ttg	1152
Arg	Ala	Thr	Ala	Ile	Ile	Arg	Lys	Ala	Thr	Arg	Arg	Leu	Ile	Gln	Leu	
				370					375					380		
ata	gta	agt	ggg	aga	gat	gaa	caa	tca	att	gct	gaa	gca	ata	att	gta	1200
Ile	Val	Ser	Gly	Arg	Asp	Glu	Gln	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ile	Ile	Val	
				385					390					395	400	
gcc	atg	gtg	ttt	tcg	caa	gaa	gat	tgc	atg	ata	aaa	gca	ggt	cga	ggc	1248
Ala	Met	Val	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Cys	Met	Ile	Lys	Ala	Val	Arg	Gly	
				405					410					415		
gat	ttg	aac	ttt	gtt	aat	aga	gca	aat	cag	cgt	ttg	aac	ccc	atg	cat	1296
Asp	Leu	Asn	Phe	Val	Asn	Arg	Ala	Asn	Gln	Arg	Leu	Asn	Pro	Met	His	
				420					425					430		
caa	ctc	ttg	agg	cat	ttc	caa	aaa	gat	gca	aaa	gtg	ctt	ttc	caa	aat	1344
Gln	Leu	Leu	Arg	His	Phe	Gln	Lys	Asp	Ala	Lys	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	
				435					440					445		
tgg	gga	att	gaa	ccc	atc	gac	aat	gta	atg	ggg	atg	att	gga	ata	ttg	1392
Trp	Gly	Ile	Glu	Pro	Ile	Asp	Asn	Val	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Ile	Leu	
				450					455					460		
cct	gac	atg	acc	cca	agc	acc	gag	atg	tca	ttg	aga	gga	gtg	aga	gtc	1440
Pro	Asp	Met	Thr	Pro	Ser	Thr	Glu	Met	Ser	Leu	Arg	Gly	Val	Arg	Val	
				465					470					475	480	
agc	aaa	atg	gga	gtg	gat	gag	tac	tcc	agc	act	gag	aga	gtg	gtg	gtg	1488
Ser	Lys	Met	Gly	Val	Asp	Glu	Tyr	Ser	Ser	Thr	Glu	Arg	Val	Val	Val	

ES 2 393 406 T3

				485					490					495					
agc	att	gac	cgt	ttt	tta	aga	ggt	cgg	gat	caa	agg	gga	aac	ata	cta				1536
Ser	Ile	Asp	Arg	Phe	Leu	Arg	Val	Arg	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile	Leu				
			500					505					510						
ctg	tcc	cct	gaa	gaa	gtc	agt	gaa	aca	caa	gga	acg	gaa	aag	ctg	aca				1584
Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Lys	Leu	Thr				
			515				520					525							
ata	att	tat	tcg	tca	tca	atg	atg	tgg	gag	att	aat	ggt	ccc	gaa	tca				1632
Ile	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ser	Met	Met	Trp	Glu	Ile	Asn	Gly	Pro	Glu	Ser				
			530			535					540								
gtg	ttg	gtc	aat	act	tat	caa	tgg	atc	atc	aga	aac	tgg	gaa	att	gta				1680
Val	Leu	Val	Asn	Thr	Tyr	Gln	Trp	Ile	Ile	Arg	Asn	Trp	Glu	Ile	Val				
			545		550			555							560				
aaa	att	cag	tgg	tca	cag	gac	ccc	aca	atg	tta	tac	aat	aag	ata	gaa				1728
Lys	Ile	Gln	Trp	Ser	Gln	Asp	Pro	Thr	Met	Leu	Tyr	Asn	Lys	Ile	Glu				
				565				570						575					
ttt	gaa	cca	ttc	caa	tcc	ctg	gtc	cct	agg	gcc	acc	aga	agc	caa	tac				1776
Phe	Glu	Pro	Phe	Gln	Ser	Leu	Val	Pro	Arg	Ala	Thr	Arg	Ser	Gln	Tyr				
			580					585					590						
agc	ggt	ttc	gta	aga	acc	ctg	ttt	cag	caa	atg	cga	gat	gta	ctt	gga				1824
Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Thr	Leu	Phe	Gln	Gln	Met	Arg	Asp	Val	Leu	Gly				
			595				600					605							
aca	ttt	gat	act	gct	caa	ata	ata	aaa	ctc	ctc	cct	ttt	gcc	gct	gct				1872
Thr	Phe	Asp	Thr	Ala	Gln	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Ala	Ala				
			610			615					620								
cct	ccg	gaa	cag	agt	agg	atg	cag	ttc	tct	tct	ttg	act	gtt	aat	gta				1920
Pro	Pro	Glu	Gln	Ser	Arg	Met	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Val				
			625		630					635				640					
aga	ggt	tcg	gga	atg	agg	ata	ctt	gta	aga	ggc	aat	tcc	cca	gtg	ttc				1968
Arg	Gly	Ser	Gly	Met	Arg	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Phe				
				645				650						655					
aac	tac	aat	aaa	gtc	act	aaa	agg	ctc	aca	gtc	ctc	gga	aag	gat	gca				2016
Asn	Tyr	Asn	Lys	Val	Thr	Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Asp	Ala				
			660				665						670						
ggt	gcg	ctt	act	gag	gac	cca	gat	gaa	ggt	acg	gct	gga	gta	gag	tct				2064
Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Pro	Asp	Glu	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Glu	Ser				
			675				680					685							
gct	gtt	cta	aga	ggg	ttt	ctc	att	tta	ggt	aaa	gaa	aac	aag	aga	tat				2112
Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Lys	Glu	Asn	Lys	Arg	Tyr				
			690			695					700								
ggc	cca	gca	cta	agc	atc	aat	gaa	ctt	agc	aaa	ctt	gca	aaa	ggg	gag				2160
Gly	Pro	Ala	Leu	Ser	Ile	Asn	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Lys	Gly	Glu				
			705		710					715				720					
aaa	gcc	aat	gta	cta	att	ggg	caa	ggg	gac	gta	gtg	ttg	gta	atg	aaa				2208
Lys	Ala	Asn	Val	Leu	Ile	Gly	Gln	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Val	Met	Lys				

ES 2 393 406 T3

```

          725                730                735
cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act gac agc cag aca gcg acc aaa      2256
Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
          740                745                750

agg att cgg atg gcc atc aat tag      2280
Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
          755

```

5
 <210> 48
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 48

```

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1                    5                    10                    15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
          20                    25                    30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
          35                    40                    45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
          50                    55                    60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65                    70                    75                    80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
          85                    90                    95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Asn Thr Ile His Tyr Pro
          100                   105                   110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
          115                   120                   125

Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
          130                   135                   140

Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
 145                   150                   155                   160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile
          165                   170                   175

```

10

ES 2 393 406 T3

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr
 210 215 220

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
 245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
 260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415

ES 2 393 406 T3

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
 435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
 450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
 465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
 485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
 500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
 515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
 530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
 545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
 565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln/Tyr
 580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
 595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
 610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
 625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
 645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
 660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
 675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
 690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
 705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
 725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
 740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 755

<210> 49
 <211> 2274
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2274)

10

<400> 49

atg gat gtc aat ccg act cta ctt ttc tta aag gtg cca gcg caa aat	48
Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn	
1 5 10 15	
gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat	96
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His	
20 25 30	
gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa	144
Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln	
35 40 45	
tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca	192
Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro	
50 55 60	
caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt	240
Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser	
65 70 75 80	

ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa	288
Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu	
85 90 95	
gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag	336
Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu	
100 105 110	
gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act	384
Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr	
115 120 125	
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct	432
Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala	
130 135 140	
aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg acc tcc aat gaa tcg	480
Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser	
145 150 155 160	
ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag	528
Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys	
165 170 175	
gag gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga	576
Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg	
180 185 190	
gac aac atg aca aag aga atg ata aca cag aga acc ata gga aag aaa	624
Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys	
195 200 205	
aaa caa cga tta agc aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta	672
Lys Gln Arg Leu Ser Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu	
210 215 220	
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca	720
Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala	
225 230 235 240	
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga gga ttt gta tat ttt gtt gaa	768
Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu	
245 250 255	
aca cta gct cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca	816
Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro	
260 265 270	
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa	864
Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys	
275 280 285	
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg	912
Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly	
290 295 300	
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca	960
Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala	
305 310 315 320	

ES 2 393 406 T3

atg atc aca tac ata act aga gat cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt	1008
Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asp Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val	
325 330 335	
cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg	1056
Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly	
340 345 350	
aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata	1104
Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile	
355 360 365	
cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca	1152
Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser	
370 375 380	
aca aaa aag aaa att gaa aag ata cga cca ctc ctg gtt gac ggg act	1200
Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr	
385 390 395 400	
gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc	1248
Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser	
405 410 415	
act gtg ctg ggt gta tcc ata tta aac ctg ggc cag agg aaa tat aca	1296
Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr	
420 425 430	
aag acc aca tac tgg tgg gat ggt ctg caa tca tcc gat gac ttt gct	1344
Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala	
435 440 445	
ttg ata gtg aat gcg cct aat cat gaa gga ata caa gct gga gta gac	1392
Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp	
450 455 460	
aga ttc tat aga act tgc aaa ctg gtc ggg atc aac atg agc aaa aag	1440
Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys	
465 470 475 480	
aag tcc tac ata aat aga act gga aca ttc gaa ttc aca agc ttt ttc	1488
Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe	
485 490 495	
tac cgg tat ggt ttt gta gcc aat ttc agc atg gaa cta ccc agt ttt	1536
Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe	
500 505 510	
ggg gtt tcc gga ata aat gaa tct gca gac atg agc att gga gtg aca	1584
Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr	
515 520 525	
gtc atc aaa aac aac atg ata aat aat gat ctc ggt cct gcc acg gca	1632
Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala	
530 535 540	
caa atg gca ctc caa ctc ttc att aag gat tat cgg tac aca tac cgg	1680
Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg	
545 550 555 560	

ES 2 393 406 T3

tgc cat aga ggt gat acc cag ata caa acc aga aga tct ttt gag ttg	1728
Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu	
565 570 575	
aag aaa ctg tgg gaa cag act cga tca aag act ggt cta ctg gta tca	1776
Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser	
580 585 590	
gat ggg ggt cca aac cta tat aac atc aga aac cta cac atc ccg gaa	1824
Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu	
595 600 605	
gtc tgt tta aaa tgg gag cta atg gat gaa gat tat aag ggg agg cta	1872
Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu	
610 615 620	
tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc	1920
Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val	
625 630 635 640	
aac agt gca gta gta atg cct gct cat ggc cct gcc aaa agc atg gag	1968
Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu	
645 650 655	
tat gat get gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg	2016
Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg	
660 665 670	
tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga ata cta gaa gat gag cag atg	2064
Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met	
675 680 685	
tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca	2112
Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser	
690 695 700	
tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gta tcc	2160
Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser	
705 710 715 720	
agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag	2208
Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys	
725 730 735	
aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag	2256
Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu	
740 745 750	
ctc aga cgg caa aaa tag	2274
Leu Arg Arg Gln Lys	
755	

<210> 50

<211> 757

<212> PRT

<213> Virus de la gripe

<400> 50

ES 2 393 406 T3

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
 50 55 60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
 85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
 100 105 110

Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
 115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
 130 135 140

Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
 165 170 175

Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
 180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
 195 200 205

Lys Gln Arg Leu Ser Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
 210 215 220

Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
 225 230 235 240

ES 2 393 406 T3

Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
 245 250 255

Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
 260 265 270

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
 275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
 290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
 305 310 315 320

Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asp Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 355 360 365

Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
 370 375 380

Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
 405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr
 420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
 435 440 445

Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp
 450 455 460

Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
 465 470 475 480

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495
 Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510
 Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
 515 520 525
 Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
 530 535 540
 Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
 545 550 555 560
 Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu
 565 570 575
 Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser
 580 585 590
 Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
 595 600 605
 Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610 615 620
 Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
 625 630 635 640
 Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655
 Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670
 Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685
 Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700
 Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720

ES 2 393 406 T3

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
 725 730 735

Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
 740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys
 755

5 <210> 51
 <211> 2151
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2151)

<400> 51

atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt	48
Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu	
1 5 10 15	
gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca	96
Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr	
20 25 30	
aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac	144
Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr	
35 40 45	
tcg gat ttc cac ttt ata aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag	192
Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu	
50 55 60	
tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag	240
Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu	
65 70 75 80	
ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac	288
Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn	
85 90 95	
acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat	336
Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr	
100 105 110	
aaa gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac	384
Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His	
115 120 125	
ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat	432
Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His	
130 135 140	

atc cac att ttc tca ttt aca gga gaa gaa atg gct aca aaa gcg gac Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp 145 150 155 160	480
tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe 165 170 175	528
act ata aga caa gaa atg gcc agt aga gcc ctc tgg gat tcc ttt cgt Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg 180 185 190	576
cag tcc gag aga gcc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa atc aca Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr 195 200 205	624
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser 210 215 220	672
agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat ata gat gga ttc gaa ccg aac ggc Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly 225 230 235 240	720
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aaa Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys 245 250 255	768
ata gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly 260 265 270	816
ggt cca ccc tgc cat cag cga tcc aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu 275 280 285	864
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag ggg ata cca cta Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu 290 295 300	912
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro 305 310 315 320	960
agt att gtt aaa cca cat aaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln 325 330 335	1008
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu 340 345 350	1056
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp 355 360 365	1104
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys 370 375 380	1152

ES 2 393 406 T3

aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa gca	1200
Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala	
385	390 395 400
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aag gct tgt gag	1248
Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu	
	405 410 415
ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc	1296
Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val	
	420 425 430
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct	1344
Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala	
	435 440 445
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata atg aaa gga gtg tac	1392
Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr	
	450 455 460
atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt	1440
Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe	
	465 470 475 480
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg	1488
Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg	
	485 490 495
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga	1536
Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg	
	500 505 510
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act	1584
Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr	
	515 520 525
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa	1632
Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu	
	530 535 540
att gga gac atg ctt tta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc	1680
Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro	
	545 550 555 560
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa	1728
Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys	
	565 570 575
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att	1776
Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile	
	580 585 590
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc	1824
Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr	
	595 600 605
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc	1872
Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser	
	610 615 620

ES 2 393 406 T3

ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta 1920
 Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa 1968
 Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

gga ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt 2016
 Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

aga gat gac ctg gaa cct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa 2064
 Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685

tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca 2112
 Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700

tct tgg ttc aac tcc ttc ctc aca cat gca ctg aag tag 2151
 Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

<210> 52
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 52

5

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

10

ES 2 393 406 T3

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125
 Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140
 Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160
 Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175
 Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190
 Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
 195 200 205
 Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
 210 215 220
 Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
 225 230 235 240
 Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys
 245 250 255
 Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
 260 265 270
 Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
 290 295 300
 Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
 305 310 315 320
 Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
 325 330 335
 Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
 340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
 355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
 370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
 405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
 420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

ES 2 393 406 T3

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

<210> 53
 <211> 844
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(690)

10

<400> 53

atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg 48
 Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

cat gtc cgt aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc 96
 His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30

ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc 144
 Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata 192
 Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60

gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc 240

ES 2 393 406 T3

```

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65              70              75              80

att gcc tct gtt cct gct tca cgc tac tta act gac atg act ctt gat      288
Ile Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
              85              90              95

gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca      336
Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
              100              105              110

ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc      384
Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
              115              120              125

ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa agg ctg gaa aca cta      432
Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Arg Leu Glu Thr Leu
              130              135              140

ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att      480
Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
145              150              155              160

tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat      528
Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
              165              170              175

gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt      576
Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
              180              185              190

aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gaa      624
Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
              195              200              205

aat ggg aga cct tca ttc cct tca aaa cag aaa cga aaa atg gag aga      672
Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys Arg Lys Met Glu Arg
              210              215              220

aca att aag cca gaa att tgaagaaata agatggttga ttgaagaagt      720
Thr Ile Lys Pro Glu Ile
225              230

gcgacataga ttgaaaaata cagaaaatag ttttgaacaa ataacattta tgcaagcctt      780

acaactattg cttgaagtag aacaagagat aagaactttc tcgtttcagc ttatttaatg      840

ataa                                                                 844

```

<210> 54
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 54

```

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1          5          10          15

```

10

ES 2 393 406 T3

His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80

Ile Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
 85 90 95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
 100 105 110

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Arg Leu Glu Thr Leu
 130 135 140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys Arg Lys Met Glu Arg
 210 215 220

Thr Ile Lys Pro Glu Ile
 225 230

<210> 55
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(1497)

<400> 55

atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat	48
Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp	
1 5 10 15	
ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg	96
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met	
20 25 30	
gtg gga gga atc gga cgg ttt tat gtc cag atg tgt act gag ctt aaa	144
Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys	
35 40 45	
cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa	192
Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu	
50 55 60	
agg atg gtg ctt tgc gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag	240
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu	
65 70 75 80	
gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata	288
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile	
85 90 95	
tac aga aga aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat	336
Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp	
100 105 110	
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac	384
Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp	
115 120 125	
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat	432
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn	
130 135 140	
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat	480
Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp	
145 150 155 160	
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct	528
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser	
165 170 175	
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggc gtt gga aca atg gta atg gaa	576
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu	
180 185 190	
ctc atc aga atg atc aag cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga	624
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg	
195 200 205	

ggg gaa aat ggt cga aga acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat	672
Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn	
210 215 220	
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac	720
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp	
225 230 235 240	
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc	768
Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu	
245 250 255	
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat	816
Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His	
260 265 270	
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca gta acc agt ggg	864
Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly	
275 280 285	
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc	912
Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe	
290 295 300	
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa	960
Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu	
305 310 315 320	
aac cca gca cac aaa agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca	1008
Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala	
325 330 335	
gca ttt gag gat ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta	1056
Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val	
340 345 350	
atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat	1104
Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn	
355 360 365	
gaa aac atg gag aca ata aat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa	1152
Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys	
370 375 380	
tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga	1200
Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg	
385 390 395 400	
gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga	1248
Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg	
405 410 415	
aat ctt ccc ttt gag aga gca acc att atg gct gca ttc act ggt aac	1296
Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn	
420 425 430	
act gaa gga agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg	1344
Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met	
435 440 445	

ES 2 393 406 T3

```

gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc      1392
Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
  450                      455                      460

gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac      1440
Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
  465                      470                      475                      480

atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt      1488
Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
                      485                      490                      495

gac agt taa
Asp Ser
                                                    1497
  
```

<210> 56
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 56

```

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
  1                      5                      10                      15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
                      20                      25                      30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
                      35                      40                      45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
  50                      55                      60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
  65                      70                      75                      80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
                      85                      90                      95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
                      100                      105                      110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
                      115                      120                      125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
  130                      135                      140
  
```

10

ES 2 393 406 T3

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
 245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Mét
 435 440 445

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

Asp Ser

<210> 57
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

10

<400> 57

atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg 48
 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca 96
 Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30

gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg 144
 Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45

atc ata aga gaa tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa ctt act caa 192
 Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Leu Thr Gln
 50 55 60

tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa 240

Trp	Tyr	Asn	Thr	Ser	Thr	Ile	Lys	Tyr	Ile	Glu	Arg	Pro	Ser	Asn	Glu		
65					70					75					80		
tac	tac	atg	aat	aac	act	gaa	cca	ctt	tgt	gag	gcc	caa	ggc	ttt	gca		288
Tyr	Tyr	Met	Asn	Asn	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Glu	Ala	Gln	Gly	Phe	Ala		
			85						90					95			
cca	ttt	tcc	aaa	gat	aat	gga	ata	cga	att	ggg	tcg	aga	ggc	cat	gtt		336
Pro	Phe	Ser	Lys	Asp	Asn	Gly	Ile	Arg	Ile	Gly	Ser	Arg	Gly	His	Val		
			100					105						110			
ttt	gtg	ata	aga	gaa	cct	ttt	gta	tca	tgt	tcg	ccc	tca	gaa	tgt	aga		384
Phe	Val	Ile	Arg	Glu	Pro	Phe	Val	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	Glu	Cys	Arg		
			115					120					125				
acc	ttt	ttc	ctc	aca	cag	ggc	tca	tta	ctc	aat	gac	aaa	cat	tct	aac		432
Thr	Phe	Phe	Leu	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Lys	His	Ser	Asn		
			130					135				140					
ggc	aca	ata	aag	gat	cga	agt	ccg	tat	agg	act	ttg	atg	agt	gtc	aaa		480
Gly	Thr	Ile	Lys	Asp	Arg	Ser	Pro	Tyr	Arg	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Lys		
					150						155				160		
ata	ggg	caa	tca	cct	aat	gta	tat	caa	gct	agg	ttt	gaa	tcg	gtg	gca		528
Ile	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	Val	Tyr	Gln	Ala	Arg	Phe	Glu	Ser	Val	Ala		
					165					170					175		
tgg	tca	gca	aca	gca	tgc	cat	gat	gga	aaa	aaa	tgg	atg	aca	gtt	gga		576
Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Met	Thr	Val	Gly		
					180						185				190		
gtc	aca	ggg	ccc	gac	aat	caa	gca	att	gca	gta	gtg	aac	tat	gga	ggt		624
Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Tyr	Gly	Gly		
			195						200					205			
gtt	ccg	gtt	gat	att	att	aat	tca	tgg	gca	ggg	gat	att	tta	aga	acc		672
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Ser	Trp	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr		
			210					215						220			
caa	gaa	tca	tca	tgc	acc	tgc	att	aaa	gga	gac	tgt	tat	tgg	gta	atg		720
Gln	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Cys	Ile	Lys	Gly	Asp	Cys	Tyr	Trp	Val	Met		
					225						235				240		
act	gat	gga	ccg	gca	aat	agg	caa	gct	aaa	tat	agg	ata	ttc	aaa	gca		768
Thr	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala		
					245						250				255		
aaa	gat	gga	aga	gta	att	gga	caa	act	gat	ata	agt	ttc	aat	ggg	gga		816
Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	Phe	Asn	Gly	Gly		
					260					265					270		
cac	ata	gag	gag	tgt	tct	tgt	tac	ccc	aat	gaa	ggg	aag	gtg	gaa	tgc		864
His	Ile	Glu	Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asn	Glu	Gly	Lys	Val	Glu	Cys		
					275										285		
ata	tgc	agg	gac	aat	tgg	act	gga	aca	aat	aga	cca	att	ctg	gta	ata		912
Ile	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Ile	Leu	Val	Ile		
					290										300		
tct	tct	gat	cta	tcg	tac	aca	gtt	gga	tat	ttg	tgt	gct	ggc	att	ccc		960

Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro
 305 310 315 320

act gac act cct agg gga gag gat agt caa ttc aca ggc tca tgt aca 1008
 Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr
 325 330 335

agt cct ttg gga aat aaa gga tac ggt gta aaa ggc ttc ggg ttt cga 1056
 Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg
 340 345 350

caa gga act gac gta tgg gcc gga agg aca att agt agg act tca aga 1104
 Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
 355 360 365

tca gga ttc gaa ata ata aaa atc agg aat ggt tgg aca cag aac agt 1152
 Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380

aag gac caa atc agg agg caa gtg att atc gat gac cca aat tgg tca 1200
 Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400

gga tat agc ggt tct ttc aca ttg ccg gtt gaa ctg aca aaa aag gga 1248
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415

tgt ttg gtc ccc tgt ttc tgg gtt gaa atg att aga ggt aaa cct gaa 1296
 Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430

gaa aca aca ata tgg acc tct agc agc tcc att gtg atg tgt gga gta 1344
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445

gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc 1392
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460

ttt gac atc gat aag atg taa 1413
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 58
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 58

5

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr

10

ES 2 393 406 T3

			35					40						45			
Ile	Ile	Arg	Glu	Tyr	Asn	Glu	Thr	Val	Arg	Val	Glu	Lys	Leu	Thr	Gln		
	50					55					60						
Trp	Tyr	Asn	Thr	Ser	Thr	Ile	Lys	Tyr	Ile	Glu	Arg	Pro	Ser	Asn	Glu		
65					70					75				80			
Tyr	Tyr	Met	Asn	Asn	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Glu	Ala	Gln	Gly	Phe	Ala		
				85					90					95			
Pro	Phe	Ser	Lys	Asp	Asn	Gly	Ile	Arg	Ile	Gly	Ser	Arg	Gly	His	Val		
			100					105					110				
Phe	Val	Ile	Arg	Glu	Pro	Phe	Val	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	Glu	Cys	Arg		
		115					120					125					
Thr	Phe	Phe	Leu	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Lys	His	Ser	Asn		
	130					135					140						
Gly	Thr	Ile	Lys	Asp	Arg	Ser	Pro	Tyr	Arg	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Lys		
145					150					155					160		
Ile	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	Val	Tyr	Gln	Ala	Arg	Phe	Glu	Ser	Val	Ala		
				165					170						175		
Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Met	Thr	Val	Gly		
			180					185					190				
Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Tyr	Gly	Gly		
		195					200					205					
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Ser	Trp	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr		
	210					215					220						
Gln	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Cys	Ile	Lys	Gly	Asp	Cys	Tyr	Trp	Val	Met		
225					230					235					240		
Thr	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala		
				245					250					255			
Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	Phe	Asn	Gly	Gly		
			260					265					270				
His	Ile	Glu	Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asn	Glu	Gly	Lys	Val	Glu	Cys		

ES 2 393 406 T3

275		280		285											
Ile	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Ile	Leu	Val	Ile
	290					295					300				
Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Pro
305					310					315					320
Thr	Asp	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser	Gln	Phe	Thr	Gly	Ser	Cys	Thr
				325					330					335	
Ser	Pro	Leu	Gly	Asn	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Arg
			340					345					350		
Gln	Gly	Thr	Asp	Val	Trp	Ala	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	Arg
		355					360					365			
Ser	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Trp	Thr	Gln	Asn	Ser
	370					375					380				
Lys	Asp	Gln	Ile	Arg	Arg	Gln	Val	Ile	Ile	Asp	Asp	Pro	Asn	Trp	Ser
385					390					395					400
Gly	Tyr	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly
				405					410					415	
Cys	Leu	Val	Pro	Cys	Phe	Trp	Val	Glu	Met	Ile	Arg	Gly	Lys	Pro	Glu
			420					425					430		
Glu	Thr	Thr	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Val	Met	Cys	Gly	Val
		435					440					445			
Asp	His	Lys	Ile	Ala	Ser	Trp	Ser	Trp	His	Asp	Gly	Ala	Ile	Leu	Pro
	450					455					460				
Phe	Asp	Ile	Asp	Lys	Met										
465					470										

- <210> 59
- <211> 981
- 5 <212.> ADN
- <213> Virus de la gripe
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1).. (756)
- <400> 59

ES 2 393 406 T3

atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca	48
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro	
1 5 10 15	
tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt	96
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe	
20 25 30	
gcg gga aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca	144
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr	
35 40 45	
aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc	192
Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe	
50 55 60	
acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc	240
Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val	
65 70 75 80	
caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca	288
Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala	
85 90 95	
gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca	336
Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala	
100 105 110	
aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg	384
Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met	
115 120 125	
gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt	432
Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe	
130 135 140	
ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga	480
Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg	
145 150 155 160	
tct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca tta atc aga cat gaa	528
Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu	
165 170 175	
aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg	576
Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met	
180 185 190	
gca gga tcg agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg	624
Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg	
195 200 205	
gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc	672
Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser	
210 215 220	
tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac	720
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr	

ES 2 393 406 T3

```

225                230                235                240
cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc      766
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
                245                250

gtcattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt      826

ttottcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa      886

ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt      946

gacgatggtc atttgtcaa catagagctg gagta                                981

```

<210> 60
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 60

```

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
1                5                10                15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
                20                25                30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
                35                40                45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
                50                55                60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65                70                75                80

Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
                85                90                95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
                100                105                110

Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
                115                120                125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
                130                135                140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145                150                155                160

```

10

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
 165 170 175
 Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190
 Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg
 195 200 205
 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
 210 215 220
 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

<210> 61
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 61

atg aag aca acc att att tta ata cta ctg acc cat tgg gcc tac agt 48
 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15
 caa aac cca atc agt ggc aat aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac 96
 Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30
 cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca atg agt gat gat caa 144
 His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45
 att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg 192
 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60
 aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca 240
 Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80
 tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat 288
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95

ES 2 393 406 T3

gag agt tgg gac ctc ttt ata gaa aga agc agc gct ttc agc aat tgc	336
Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys	
100 105 110	
tac cca tat gac atc cct gac tat gca tcg ctc cga tcc att gta gca	384
Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala	
115 120 125	
tcc tca ggg aca gtg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt	432
Ser Ser Gly Thr Val Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly	
130 135 140	
gta act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat	480
Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp	
145 150 155 160	
agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg cta aca aaa tct gga agc tct tac	528
Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr	
165 170 175	
ccc aca ttg aat gtg aca atg cct aac aat aaa aat ttc gac aag cta	576
Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu	
180 185 190	
tac atc tgg ggg att cat cac ccg agc tca aat caa gag cag aca aaa	624
Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys	
195 200 205	
ttg tac atc caa gaa tca gga cga gta aca gtc tca aca aaa aga agt	672
Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser	
210 215 220	
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tct aga ccg ttg gtc aga ggt	720
Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly	
225 230 235 240	
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat	768
Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp	
245 250 255	
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat	816
Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr	
260 265 270	
ttt aaa ttg aac aca ggg aaa agc tct gta atg aga tcc gat gta ccc	864
Phe Lys Leu Asn Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro	
275 280 285	
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc	912
Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser	
290 295 300	
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc	960
Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys	
305 310 315 320	
ccc aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg	1008
Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg	
325 330 335	

ES 2 393 406 T3

aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga	1056
Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly	
340 345 350	
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc	1104
Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe	
355 360 365	
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc	1152
Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser	
370 375 380	
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att	1200
Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile	
385 390 395 400	
gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa	1248
Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu	
405 410 415	
gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa	1296
Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys	
420 425 430	
ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat	1344
Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn	
435 440 445	
caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag	1392
Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu	
450 455 460	
aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga	1440
Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly	
465 470 475 480	
tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gaa tca ata	1488
Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile	
485 490 495	
aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aaa gat gaa gca tta aac	1536
Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn	
500 505 510	
aat cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat	1584
Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp	
515 520 525	
tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt	1632
Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val	
530 535 540	
gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aaa ggc aac atc aga	1680
Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg	
545 550 555 560	
tgc aac att tgc att tga	1698
Cys Asn Ile Cys Ile	
565	

<210> 62
<211> 565

ES 2 393 406 T3

<212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<400> 62

5

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125

Ser Ser Gly Thr Val Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140

Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160

Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175

Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 180 185 190

Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 195 200 205

ES 2 393 406 T3

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 210 215 220

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 225 230 235 240

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 260 265 270

Phe Lys Leu Asn Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro
 275 280 285

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 355 360 365

Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

ES 2 393 406 T3

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile
 485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 63
 <211> 2280
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2280)

10

<400> 63

atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc 48
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15

cgc gag ata cta aca aaa act act gtg gac cac atg gcc ata atc aag 96
 Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

aaa tac aca tca gga aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa 144
 Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45

tgg atg atg gca atg aaa tac cca att aca gca gat aag agg ata atg 192
 Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60

ES 2 393 406 T3

gag atg att cct gag aga aat gaa cag gga caa acc ctt tgg agc aaa	240
Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys	
65 70 75 80	
acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg	288
Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val	
85 90 95	
aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg aac aca att cat tat cca	336
Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Asn Thr Ile His Tyr Pro	
100 105 110	
aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga	384
Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly	
115 120 125	
acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga	432
Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg	
130 135 140	
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac ctc agt gct aaa gaa gca caa	480
Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln	
145 150 155 160	
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc aga att	528
Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile	
165 170 175	
cta aca tca gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa	576
Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu	
180 185 190	
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa	624
Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu	
195 200 205	
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gta ggc gga aca	672
Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr	
210 215 220	
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg	720
Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp	
225 230 235 240	
gag caa atg tac acc cca gga gga aaa gtt aga aac gat gat att gat	768
Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp	
245 250 255	
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gca aca gta	816
Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val	
260 265 270	
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag	864
Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln	
275 280 285	
att ggt gga aca agg atg gta gac atc ctt aag cag aac cca aca gag	912
Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu	
290 295 300	

ES 2 393 406 T3

gaa	caa	gct	gtg	gat	ata	tgc	aaa	gca	gca	atg	gga	ttg	aga	att	agc	960
Glu	Gln	Ala	Val	Asp	Ile	Cys	Lys	Ala	Ala	Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Ser	
305					310					315					320	
tca	tca	ttc	agc	ttt	ggt	gga	ttc	acc	ttc	aaa	agg	aca	agt	gga	tca	1008
Ser	Ser	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Phe	Thr	Phe	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Ser	
				325					330					335		
tca	gtc	aag	aga	gaa	gaa	gaa	atg	ctt	acg	ggc	aac	ctt	caa	aca	ttg	1056
Ser	Val	Lys	Arg	Glu	Glu	Glu	Met	Leu	Thr	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Leu	
			340					345					350			
aaa	ata	aga	gtg	cat	gag	ggc	tat	gaa	gaa	ttc	aca	atg	gtc	gga	aga	1104
Lys	Ile	Arg	Val	His	Glu	Gly	Tyr	Glu	Glu	Phe	Thr	Met	Val	Gly	Arg	
		355					360					365				
aga	gca	aca	gcc	att	atc	aga	aag	gca	acc	aga	aga	ttg	att	caa	ttg	1152
Arg	Ala	Thr	Ala	Ile	Ile	Arg	Lys	Ala	Thr	Arg	Arg	Leu	Ile	Gln	Leu	
	370					375					380					
ata	gta	agt	ggg	aga	gat	gaa	caa	tca	att	gct	gaa	gca	ata	att	gta	1200
Ile	Val	Ser	Gly	Arg	Asp	Glu	Gln	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ile	Ile	Val	
385					390					395					400	
gcc	atg	gtg	ttt	tcg	caa	gaa	gat	tgc	atg	ata	aaa	gca	ggt	cga	ggc	1248
Ala	Met	Val	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Cys	Met	Ile	Lys	Ala	Val	Arg	Gly	
				405					410					415		
gat	ttg	aac	ttt	ggt	aat	aga	gca	aat	cag	cgt	ttg	aac	ccc	atg	cat	1296
Asp	Leu	Asn	Phe	Val	Asn	Arg	Ala	Asn	Gln	Arg	Leu	Asn	Pro	Met	His	
			420					425					430			
caa	ctc	ttg	agg	cat	ttc	caa	aaa	gat	gca	aaa	gtg	ctt	ttc	caa	aat	1344
Gln	Leu	Leu	Arg	His	Phe	Gln	Lys	Asp	Ala	Lys	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	
		435					440					445				
tgg	gga	att	gaa	ccc	atc	gac	aat	gta	atg	ggg	atg	att	gga	ata	ttg	1392
Trp	Gly	Ile	Glu	Pro	Ile	Asp	Asn	Val	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Ile	Leu	
	450					455					460					
cct	gac	atg	acc	cca	agc	acc	gag	atg	tca	ttg	aga	gga	gtg	aga	gtc	1440
Pro	Asp	Met	Thr	Pro	Ser	Thr	Glu	Met	Ser	Leu	Arg	Gly	Val	Arg	Val	
465					470					475					480	
agc	aaa	atg	gga	gtg	gat	gag	tac	tcc	agc	act	gag	aga	gtg	gtg	gtg	1488
Ser	Lys	Met	Gly	Val	Asp	Glu	Tyr	Ser	Ser	Thr	Glu	Arg	Val	Val	Val	
				485					490					495		
agc	att	gac	cgt	ttt	tta	aga	ggt	cgg	gat	caa	agg	gga	aac	ata	cta	1536
Ser	Ile	Asp	Arg	Phe	Leu	Arg	Val	Arg	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile	Leu	
			500					505					510			
ctg	tcc	cct	gaa	gaa	gtc	agt	gaa	aca	caa	gga	acg	gaa	aag	ctg	aca	1584
Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Lys	Leu	Thr	
		515					520					525				
ata	att	tat	tcg	tca	tca	atg	atg	tgg	gag	att	aat	ggt	ccc	gaa	tca	1632
Ile	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ser	Met	Met	Trp	Glu	Ile	Asn	Gly	Pro	Glu	Ser	
	530					535					540					

gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc aga aac tgg gaa att gta	1680
Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val	
545 550 555 560	
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa	1728
Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu	
565 570 575	
ttt gaa cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac	1776
Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr	
580 585 590	
agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga	1824
Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly	
595 600 605	
aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct	1872
Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala	
610 615 620	
cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta	1920
Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val	
625 630 635 640	
aga ggt tcg gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc	1968
Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe	
645 650 655	
aac tac aat aaa gtc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca	2016
Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala	
660 665 670	
ggt gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gag tct	2064
Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser	
675 680 685	
gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gaa aac aag aga tat	2112
Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr	
690 695 700	
ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctt agc aaa ctt gca aaa ggg gag	2160
Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu	
705 710 715 720	
aaa gcc aat gta cta att ggg caa ggg gac gta gtg ttg gta atg aaa	2208
Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys	
725 730 735	
cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act gac agc cag aca gcg acc aaa	2256
Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys	
740 745 750	
agg att cgg atg gcc atc aat tag	2280
Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn	
755	

<210> 64
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 64

ES 2 393 406 T3

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
 85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Asn Thr Ile His Tyr Pro
 100 105 110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
 115 120 125

Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
 130 135 140

Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
 145 150 155 160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile
 165 170 175

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr
 210 215 220

ES 2 393 406 T3

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
 245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
 260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
 435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
 450 455 460

ES 2 393 406 T3

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr
580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
690 695 700

ES 2 393 406 T3

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
755

<210> 65
<211> 2274
5 <212> ADN
<213> Virus de la gripe

<220>
10 <221> CDS
<222> (1).. (2274)

<400> 65

atg gat gtc aat ccg act cta ctt ttc tta aag gtg cca gcg caa aat	48
Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn	
1 5 10 15	
gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat	96
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His	
20 25 30	
gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa	144
Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln	
35 40 45	
tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca	192
Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro	
50 55 60	
caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt	240
Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser	
65 70 75 80	
ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa	288
Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu	
85 90 95	
gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag	336
Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu	
100 105 110	
gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act	384
Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr	
115 120 125	
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct	432

ES 2 393 406 T3

Tyr	Asp	Trp	Thr	Leu	Asn	Arg	Asn	Gln	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala		
	130					135					140						
aat	acg	att	gaa	gta	ttc	aga	tca	aat	ggg	ctg	acc	tcc	aat	gaa	tcg		480
Asn	Thr	Ile	Glu	Val	Phe	Arg	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser		
145					150					155					160		
ggg	aga	ttg	atg	gac	ttc	ctc	aaa	gat	gtc	atg	gag	tcc	atg	aac	aag		528
Gly	Arg	Leu	Met	Asp	Phe	Leu	Lys	Asp	Val	Met	Glu	Ser	Met	Asn	Lys		
				165					170						175		
gag	gaa	atg	gaa	ata	aca	aca	cac	ttc	caa	cgg	aag	aga	aga	gta	aga		576
Glu	Glu	Met	Glu	Ile	Thr	Thr	His	Phe	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Val	Arg		
			180					185						190			
gac	aac	atg	aca	aag	aga	atg	ata	aca	cag	aga	acc	ata	gga	aag	aaa		624
Asp	Asn	Met	Thr	Lys	Arg	Met	Ile	Thr	Gln	Arg	Thr	Ile	Gly	Lys	Lys		
		195					200					205					
aaa	caa	cga	tta	agc	aga	aag	agc	tat	cta	atc	aga	aca	tta	acc	cta		672
Lys	Gln	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Ser	Tyr	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu		
	210					215					220						
aac	aca	atg	acc	aag	gac	gct	gag	aga	ggg	aaa	ttg	aaa	cga	cga	gca		720
Asn	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Arg	Arg	Ala		
225					230					235					240		
atc	gct	acc	cca	ggg	atg	cag	ata	aga	gga	ttt	gta	tat	ttt	gtt	gaa		768
Ile	Ala	Thr	Pro	Gly	Met	Gln	Ile	Arg	Gly	Phe	Val	Tyr	Phe	Val	Glu		
				245					250						255		
aca	cta	gct	cga	aga	ata	tgt	gaa	aag	ctt	gaa	caa	tca	gga	ttg	cca		816
Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Leu	Pro		
			260					265					270				
gtt	ggc	ggg	aat	gag	aaa	aag	gcc	aaa	ctg	gct	aat	gtc	gtc	aga	aaa		864
Val	Gly	Gly	Asn	Glu	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Val	Val	Arg	Lys		
		275					280					285					
atg	atg	act	aat	tcc	caa	gac	act	gaa	ctc	tcc	ttc	acc	atc	act	ggg		912
Met	Met	Thr	Asn	Ser	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Phe	Thr	Ile	Thr	Gly		
	290					295					300						
gac	aat	acc	aaa	tgg	aat	gaa	aat	cag	aac	cca	cgc	ata	ttc	ctg	gca		960
Asp	Asn	Thr	Lys	Trp	Asn	Glu	Asn	Gln	Asn	Pro	Arg	Ile	Phe	Leu	Ala		
305					310					315					320		
atg	atc	aca	tac	ata	act	aga	gat	cag	cca	gaa	tgg	ttc	aga	aat	gtt		1008
Met	Ile	Thr	Tyr	Ile	Thr	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Trp	Phe	Arg	Asn	Val		
				325					330						335		
cta	agc	att	gca	ccg	att	atg	ttc	tca	aat	aaa	atg	gca	aga	ctg	ggg		1056
Leu	Ser	Ile	Ala	Pro	Ile	Met	Phe	Ser	Asn	Lys	Met	Ala	Arg	Leu	Gly		
			340					345						350			
aaa	gga	tat	atg	ttt	gaa	agc	aaa	agt	atg	aaa	ttg	aga	act	caa	ata		1104
Lys	Gly	Tyr	Met	Phe	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Ile		
		355					360					365					
cca	gca	gaa	atg	cta	gca	agc	att	gac	cta	aaa	tat	ttc	aat	gat	tca		1152

ES 2 393 406 T3

Pro	Ala	Glu	Met	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Lys	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser		
	370					375					380						
aca	aaa	aag	aaa	att	gaa	aag	ata	cga	cca	ctc	ctg	gtt	gac	ggg	act		1200
Thr	Lys	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Arg	Pro	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Thr		
	385				390					395					400		
gct	tca	ctg	agt	cct	ggc	atg	atg	atg	gga	atg	ttc	aac	atg	ttg	agc		1248
Ala	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Met	Met	Met	Gly	Met	Phe	Asn	Met	Leu	Ser		
				405					410					415			
act	gtg	ctg	ggc	gta	tcc	ata	tta	aac	ctg	ggc	cag	agg	aaa	tat	aca		1296
Thr	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Gly	Gln	Arg	Lys	Tyr	Thr		
			420					425					430				
aag	acc	aca	tac	tgg	tgg	gat	ggt	ctg	caa	tca	tcc	gat	gac	ttt	gct		1344
Lys	Thr	Thr	Tyr	Trp	Trp	Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Asp	Asp	Phe	Ala		
		435				440						445					
ttg	ata	gtg	aat	gcg	cct	aat	cat	gaa	gga	ata	caa	gct	gga	gta	gac		1392
Leu	Ile	Val	Asn	Ala	Pro	Asn	His	Glu	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Val	Asp		
	450					455					460						
aga	ttc	tat	aga	act	tgc	aaa	ctg	gtc	ggg	atc	aac	atg	agc	aaa	aag		1440
Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr	Cys	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Met	Ser	Lys	Lys		
	465				470				475						480		
aag	tcc	tac	ata	aat	aga	act	gga	aca	ttc	gaa	ttc	aca	agc	ttt	ttc		1488
Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Arg	Thr	Gly	Thr	Phe	Glu	Phe	Thr	Ser	Phe	Phe		
				485					490					495			
tac	cgg	tat	ggc	ttt	gta	gcc	aat	ttc	agc	atg	gaa	cta	ccc	agt	ttt		1536
Tyr	Arg	Tyr	Gly	Phe	Val	Ala	Asn	Phe	Ser	Met	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe		
			500					505					510				
ggg	gtt	tcc	gga	ata	aat	gaa	tct	gca	gac	atg	agc	att	gga	gtg	aca		1584
Gly	Val	Ser	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Ala	Asp	Met	Ser	Ile	Gly	Val	Thr		
		515					520					525					
gtc	atc	aaa	aac	aac	atg	ata	aat	aat	gat	ctc	ggt	cct	gcc	acg	gca		1632
Val	Ile	Lys	Asn	Asn	Met	Ile	Asn	Asn	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Ala		
	530					535					540						
caa	atg	gca	ctc	caa	ctc	ttc	att	aag	gat	tat	cgg	tac	aca	tac	cgg		1680
Gln	Met	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Ile	Lys	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Arg		
	545				550					555					560		
tgc	cat	aga	ggc	gat	acc	cag	ata	caa	acc	aga	aga	tct	ttt	gag	ttg		1728
Cys	His	Arg	Gly	Asp	Thr	Gln	Ile	Gln	Thr	Arg	Arg	Ser	Phe	Glu	Leu		
				565					570					575			
aag	aaa	ctg	tgg	gaa	cag	act	cga	tca	aag	act	ggt	cta	ctg	gta	tca		1776
Lys	Lys	Leu	Trp	Glu	Gln	Thr	Arg	Ser	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Val	Ser		
			580					585					590				
gat	ggg	ggc	cca	aac	cta	tat	aac	atc	aga	aac	cta	cac	atc	ccg	gaa		1824
Asp	Gly	Gly	Pro	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Pro	Glu		
		595					600					605					
gtc	tgt	tta	aaa	tgg	gag	cta	atg	gat	gaa	gat	tat	aag	ggg	agg	cta		1872

```

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610                               615                               620

tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc      1920
Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
625                               630                               635                               640

aac agt gca gta gta atg cct gct cat ggc cct gcc aaa agc atg gag      1968
Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
                               645                               650                               655

tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg      2016
Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
                               660                               665                               670

tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga ata cta gaa gat gag cag atg      2064
Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
                               675                               680                               685

tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca      2112
Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
                               690                               695                               700

tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gta tcc      2160
Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
705                               710                               715                               720

agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag      2208
Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
                               725                               730                               735

aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag      2256
Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
                               740                               745                               750

ctc aga cgg caa aaa tag
Leu Arg Arg Gln Lys
                               755
    
```

<210> 66
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 66

```

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1                               5                               10                               15
    
```

```

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
                               20                               25                               30
    
```

```

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
                               35                               40                               45
    
```

```

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
    
```

10

ES 2 393 406 T3

290						295										300
Asp	Asn	Thr	Lys	Trp	Asn	Glu	Asn	Gln	Asn	Pro	Arg	Ile	Phe	Leu	Ala	
305					310					315					320	
Met	Ile	Thr	Tyr	Ile	Thr	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Trp	Phe	Arg	Asn	Val	
				325					330					335		
Leu	Ser	Ile	Ala	Pro	Ile	Met	Phe	Ser	Asn	Lys	Met	Ala	Arg	Leu	Gly	
			340					345					350			
Lys	Gly	Tyr	Met	Phe	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Ile	
		355					360					365				
Pro	Ala	Glu	Met	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Lys	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	
	370					375						380				
Thr	Lys	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Arg	Pro	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Thr	
385					390					395					400	
Ala	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Met	Met	Met	Gly	Met	Phe	Asn	Met	Leu	Ser	
				405					410					415		
Thr	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Gly	Gln	Arg	Lys	Tyr	Thr	
			420					425					430			
Lys	Thr	Thr	Tyr	Trp	Trp	Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Asp	Asp	Phe	Ala	
		435				440						445				
Leu	Ile	Val	Asn	Ala	Pro	Asn	His	Glu	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Val	Asp	
450						455					460					
Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr	Cys	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Met	Ser	Lys	Lys	
465					470					475					480	
Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Arg	Thr	Gly	Thr	Phe	Glu	Phe	Thr	Ser	Phe	Phe	
				485					490						495	
Tyr	Arg	Tyr	Gly	Phe	Val	Ala	Asn	Phe	Ser	Met	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe	
			500				505						510			
Gly	Val	Ser	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Ala	Asp	Met	Ser	Ile	Gly	Val	Thr	
		515					520					525				
Val	Ile	Lys	Asn	Asn	Met	Ile	Asn	Asn	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Ala	

ES 2 393 406 T3

530						535										540
Gln	Met	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Ile	Lys	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Arg	
545					550					555					560	
Cys	His	Arg	Gly	Asp	Thr	Gln	Ile	Gln	Thr	Arg	Arg	Ser	Phe	Glu	Leu	
				565					570					575		
Lys	Lys	Leu	Trp	Glu	Gln	Thr	Arg	Ser	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	
			580					585						590		
Asp	Gly	Gly	Pro	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Pro	Glu	
		595					600					605				
Val	Cys	Leu	Lys	Trp	Glu	Leu	Met	Asp	Glu	Asp	Tyr	Lys	Gly	Arg	Leu	
	610					615					620					
Cys	Asn	Pro	Leu	Asn	Pro	Phe	Val	Ser	His	Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	Val	
625					630					635					640	
Asn	Ser	Ala	Val	Val	Met	Pro	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Lys	Ser	Met	Glu	
				645					650					655		
Tyr	Asp	Ala	Val	Ala	Thr	Thr	His	Ser	Trp	Ile	Pro	Lys	Arg	Asn	Arg	
			660					665						670		
Ser	Ile	Leu	Asn	Thr	Ser	Gln	Arg	Gly	Ile	Leu	Glu	Asp	Glu	Gln	Met	
		675					680					685				
Tyr	Gln	Lys	Cys	Cys	Asn	Leu	Phe	Glu	Lys	Phe	Phe	Pro	Ser	Ser	Ser	
690						695					700					
Tyr	Arg	Arg	Pro	Val	Gly	Ile	Ser	Ser	Met	Val	Glu	Ala	Met	Val	Ser	
705					710					715					720	
Arg	Ala	Arg	Ile	Asp	Ala	Arg	Ile	Asp	Phe	Glu	Ser	Gly	Arg	Ile	Lys	
				725					730					735		
Lys	Asp	Glu	Phe	Ala	Glu	Ile	Met	Lys	Ile	Cys	Ser	Thr	Ile	Glu	Glu	
			740					745						750		
Leu	Arg	Arg	Gln	Lys												
				755												

<210> 67
 <211> 2151
 <212> ADN

ES 2 393 406 T3

<213> Virus de la gripe
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2151)

5

<400> 67

atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt	48
Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu	
1 5 10 15	
gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca	96
Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr	
20 25 30	
aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac	144
Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr	
35 40 45	
tcg gat ttc cac ttt ata aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag	192
Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu	
50 55 60	
tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag	240
Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu	
65 70 75 80	
ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac	288
Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn	
85 90 95	
acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat	336
Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr	
100 105 110	
aaa gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac	384
Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His	
115 120 125	
ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat	432
Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His	
130 135 140	
atc cac att ttc tca ttt aca gga gaa gaa atg gct aca aaa gcg gac	480
Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp	
145 150 155 160	
tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc	528
Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe	
165 170 175	
act ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt	576
Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg	
180 185 190	
cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa atc aca	624
Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr	

ES 2 393 406 T3

195					200					205						
ggg	acg	atg	cgc	aag	ctt	gcc	aat	tac	agt	ctc	cca	ccg	aac	ttc	tcc	672
Gly	Thr	Met	Arg	Lys	Leu	Ala	Asn	Tyr	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Phe	Ser	
	210					215					220					
agc	ctt	gaa	aat	ttt	aga	gtc	tat	ata	gat	gga	ttc	gaa	ccg	aac	ggc	720
Ser	Leu	Glu	Asn	Phe	Arg	Val	Tyr	Ile	Asp	Gly	Phe	Glu	Pro	Asn	Gly	
225					230					235					240	
tgc	att	gag	agt	aag	ctt	tct	caa	atg	tcc	aaa	gaa	gta	aat	gcc	aaa	768
Cys	Ile	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Gln	Met	Ser	Lys	Glu	Val	Asn	Ala	Lys	
				245					250					255		
ata	gaa	cca	ttt	tca	aag	aca	aca	ccc	cga	cca	ctc	aaa	atg	cca	ggt	816
Ile	Glu	Pro	Phe	Ser	Lys	Thr	Thr	Pro	Arg	Pro	Leu	Lys	Met	Pro	Gly	
			260					265					270			
ggt	cca	ccc	tgc	cat	cag	cga	tcc	aaa	ttc	ttg	cta	atg	gat	gct	ctg	864
Gly	Pro	Pro	Cys	His	Gln	Arg	Ser	Lys	Phe	Leu	Leu	Met	Asp	Ala	Leu	
	275					280						285				
aaa	ctg	agc	att	gag	gac	cca	agt	cac	gag	gga	gag	ggg	ata	cca	cta	912
Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Asp	Pro	Ser	His	Glu	Gly	Glu	Gly	Ile	Pro	Leu	
	290					295					300					
tat	gat	gca	atc	aaa	tgc	atg	aaa	act	ttc	ttt	gga	tgg	aaa	gag	ccc	960
Tyr	Asp	Ala	Ile	Lys	Cys	Met	Lys	Thr	Phe	Phe	Gly	Trp	Lys	Glu	Pro	
305				310						315					320	
agt	att	gtt	aaa	cca	cat	aaa	aag	ggt	ata	aac	ccg	aac	tat	ctc	caa	1008
Ser	Ile	Val	Lys	Pro	His	Lys	Lys	Gly	Ile	Asn	Pro	Asn	Tyr	Leu	Gln	
				325					330					335		
act	tgg	aag	caa	gta	tta	gaa	gaa	ata	caa	gac	ctt	gag	aac	gaa	gaa	1056
Thr	Trp	Lys	Gln	Val	Leu	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Asn	Glu	Glu	
			340					345					350			
agg	acc	ccc	aag	acc	aag	aat	atg	aaa	aaa	aca	agc	caa	ttg	aaa	tgg	1104
Arg	Thr	Pro	Lys	Thr	Lys	Asn	Met	Lys	Lys	Thr	Ser	Gln	Leu	Lys	Trp	
		355					360					365				
gca	cta	ggt	gaa	aat	atg	gca	cca	gag	aaa	gtg	gat	ttt	gag	gat	tgt	1152
Ala	Leu	Gly	Glu	Asn	Met	Ala	Pro	Glu	Lys	Val	Asp	Phe	Glu	Asp	Cys	
	370					375					380					
aaa	gac	atc	aat	gat	tta	aaa	caa	tat	gac	agt	gat	gag	cca	gaa	gca	1200
Lys	Asp	Ile	Asn	Asp	Leu	Lys	Gln	Tyr	Asp	Ser	Asp	Glu	Pro	Glu	Ala	
385					390					395					400	
agg	tct	ctt	gca	agt	tgg	att	caa	agt	gag	ttc	aac	aag	gct	tgt	gag	1248
Arg	Ser	Leu	Ala	Ser	Trp	Ile	Gln	Ser	Glu	Phe	Asn	Lys	Ala	Cys	Glu	
				405					410					415		
ctg	aca	gat	tca	agc	tgg	ata	gag	ctc	gat	gaa	att	ggg	gag	gat	gtc	1296
Leu	Thr	Asp	Ser	Ser	Trp	Ile	Glu	Leu	Asp	Glu	Ile	Gly	Glu	Asp	Val	
			420					425					430			
gcc	cca	ata	gaa	tac	att	gcg	agc	atg	agg	aga	aat	tat	ttt	act	gct	1344
Ala	Pro	Ile	Glu	Tyr	Ile	Ala	Ser	Met	Arg	Arg	Asn	Tyr	Phe	Thr	Ala	

ES 2 393 406 T3

435					440					445						
gag	att	tcc	cat	tgt	aga	gca	aca	gaa	tat	ata	atg	aaa	gga	gtg	tac	1392
Glu	Ile	Ser	His	Cys	Arg	Ala	Thr	Glu	Tyr	Ile	Met	Lys	Gly	Val	Tyr	
450						455					460					
atc	aac	act	gct	cta	ctc	aat	gca	tcc	tgt	gct	gcg	atg	gat	gaa	ttt	1440
Ile	Asn	Thr	Ala	Leu	Leu	Asn	Ala	Ser	Cys	Ala	Ala	Met	Asp	Glu	Phe	
465					470					475					480	
caa	tta	att	ccg	atg	ata	agt	aaa	tgc	agg	acc	aaa	gaa	ggg	aga	agg	1488
Gln	Leu	Ile	Pro	Met	Ile	Ser	Lys	Cys	Arg	Thr	Lys	Glu	Gly	Arg	Arg	
				485					490					495		
aaa	aca	aat	tta	tat	gga	ttc	ata	ata	aag	gga	agg	tcc	cat	tta	aga	1536
Lys	Thr	Asn	Leu	Tyr	Gly	Phe	Ile	Ile	Lys	Gly	Arg	Ser	His	Leu	Arg	
			500					505					510			
aat	gat	act	gac	gtg	gtg	aac	ttt	gta	agt	atg	gaa	ttt	tct	ctc	act	1584
Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Val	Asn	Phe	Val	Ser	Met	Glu	Phe	Ser	Leu	Thr	
		515					520					525				
gat	cca	aga	ttt	gag	cca	cac	aaa	tgg	gaa	aaa	tac	tgc	gtt	cta	gaa	1632
Asp	Pro	Arg	Phe	Glu	Pro	His	Lys	Trp	Glu	Lys	Tyr	Cys	Val	Leu	Glu	
	530					535					540					
att	gga	gac	atg	ctt	tta	aga	act	gct	gta	ggt	caa	gtg	tca	aga	ccc	1680
Ile	Gly	Asp	Met	Leu	Leu	Arg	Thr	Ala	Val	Gly	Gln	Val	Ser	Arg	Pro	
545					550					555					560	
atg	ttt	ttg	tat	gta	agg	aca	aat	gga	acc	tct	aaa	att	aaa	atg	aaa	1728
Met	Phe	Leu	Tyr	Val	Arg	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Lys	Ile	Lys	Met	Lys	
				565					570					575		
tgg	gga	atg	gaa	atg	agg	cgc	tgc	ctc	ctt	cag	tct	ctg	caa	cag	att	1776
Trp	Gly	Met	Glu	Met	Arg	Arg	Cys	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Gln	Gln	Ile	
			580					585					590			
gaa	agc	atg	atc	gaa	gct	gag	tcc	tca	gtc	aaa	gaa	aag	gac	atg	acc	1824
Glu	Ser	Met	Ile	Glu	Ala	Glu	Ser	Ser	Val	Lys	Glu	Lys	Asp	Met	Thr	
		595					600						605			
aaa	gaa	ttt	ttt	gag	aac	aaa	tca	gag	aca	tgg	cct	ata	gga	gag	tcc	1872
Lys	Glu	Phe	Phe	Glu	Asn	Lys	Ser	Glu	Thr	Trp	Pro	Ile	Gly	Glu	Ser	
	610					615					620					
ccc	aaa	gga	gtg	gaa	gag	ggc	tca	atc	ggg	aag	ggt	tgc	agg	acc	tta	1920
Pro	Lys	Gly	Val	Glu	Glu	Gly	Ser	Ile	Gly	Lys	Val	Cys	Arg	Thr	Leu	
625					630					635					640	
tta	gca	aaa	tct	gtg	ttt	aac	agt	tta	tat	gca	tct	cca	caa	ctg	gaa	1968
Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Phe	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gln	Leu	Glu	
				645					650					655		
gga	ttt	tca	gct	gaa	tct	agg	aaa	tta	ctt	ctc	att	ggt	cag	gct	ctt	2016
Gly	Phe	Ser	Ala	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Gln	Ala	Leu	
			660					665					670			
aga	gat	gac	ctg	gaa	cct	gga	acc	ttt	gat	att	ggg	ggg	tta	tat	gaa	2064
Arg	Asp	Asp	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Ile	Gly	Gly	Leu	Tyr	Glu	

ES 2 393 406 T3

```

        675                680                685
tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca      2112
Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
    690                695                700

tct tgg ttc aac tcc ttc ctc aca cat gca ctg aag tag      2151
Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
    705                710                715

```

<210> 68
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 68

5

```

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1                5                10                15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
                20                25                30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
                35                40                45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50                55                60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65                70                75                80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
                85                90                95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
                100                105                110

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
                115                120                125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130                135                140

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145                150                155                160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
                165                170                175

```

10

ES 2 393 406 T3

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
 195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
 210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys
 245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
 260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
 290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
 305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
 325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
 340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
 355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
 370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
 405 410 415

ES 2 393 406 T3

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
 420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

ES 2 393 406 T3

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

<210> 69
 <211> 844
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(690)

<400> 69

atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg	48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp	
1 5 10 15	
cat gtc cgt aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc	96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe	
20 25 30	
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc	144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser	
35 40 45	
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata	192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile	
50 55 60	
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc	240
Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr	
65 70 75 80	
att gcc tct gtt cct gct tca cgc tac tta act gac atg act ctt gat	288
Ile Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp	
85 90 95	
gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca	336
Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr	
100 105 110	
ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc	384
Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile	
115 120 125	

ES 2 393 406 T3

ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa agg ctg gaa aca cta 432
 Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val ile Phe Glu Arg Leu Glu Thr Leu
 130 135 140

ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att 480
 Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gaa 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

aat ggg aga cct tca ttc cct tca aaa cag aaa cga aaa atg gag aga 672
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys Arg Lys Met Glu Arg
 210 215 220

aca att aag cca gaa att tgaagaaata agatgggtga ttgaagaagt 720
 Thr Ile Lys Pro Glu Ile
 225 230

gcgacataga ttgaaaaata cagaaaatag ttttgaacaa ataacattta tgcaagcott 780

acaactattg cttgaagtag aacaagagat aagaactttc tcgtttcagc ttatttaatg 840

ataa 844

<210> 70
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 70

5

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr

10

ES 2 393 406 T3

65		70		75		80									
Ile	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Arg	Tyr	Leu	Thr	Asp	Met	Thr	Leu	Asp
				85					90					95	
Glu	Met	Ser	Arg	Asp	Trp	Phe	Met	Leu	Met	Pro	Lys	Gln	Lys	Val	Thr
			100					105					110		
Gly	Ser	Leu	Cys	Ile	Arg	Met	Asp	Gln	Ala	Ile	Met	Asp	Lys	Asn	Ile
		115					120					125			
Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Ile	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Thr	Leu
	130					135					140				
Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Thr	Glu	Glu	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Glu	Ile
145					150					155					160
Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Pro	Gly	His	Thr	Asn	Glu	Asp	Val	Lys	Asn
				165					170					175	
Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Gly	Gly	Leu	Lys	Trp	Asn	Asp	Asn	Thr	Val
			180					185						190	
Arg	Ile	Ser	Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Phe	Ala	Trp	Arg	Ser	Ser	His	Glu
		195					200					205			
Asn	Gly	Arg	Pro	Ser	Phe	Pro	Ser	Lys	Gln	Lys	Arg	Lys	Met	Glu	Arg
	210					215					220				
Thr	Ile	Lys	Pro	Glu	Ile										
225					230										

<210> 71
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1497)

10

<400> 71

atg	gcg	tct	caa	ggc	acc	aaa	cga	tcc	tat	gaa	cag	atg	gaa	act	gat	48
Met	Ala	Ser	Gln	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Tyr	Glu	Gln	Met	Glu	Thr	Asp	
1			5					10					15			

ggg	gaa	cgc	cag	aat	gca	act	gaa	atc	aga	gca	tct	gtc	gga	agg	atg	96
Gly	Glu	Arg	Gln	Asn	Ala	Thr	Glu	Ile	Arg	Ala	Ser	Val	Gly	Arg	Met	

ES 2 393 406 T3

20					25					30						
gtg	gga	gga	atc	gga	cgg	ttt	tat	gtc	cag	atg	tgt	act	gag	ctt	aaa	144
Val	Gly	Gly	Ile	Gly	Arg	Phe	Tyr	Val	Gln	Met	Cys	Thr	Glu	Leu	Lys	
		35					40					45				
cta	aac	gac	cat	gaa	ggg	cgg	ctg	att	cag	aac	agc	ata	aca	ata	gaa	192
Leu	Asn	Asp	His	Glu	Gly	Arg	Leu	Ile	Gln	Asn	Ser	Ile	Thr	Ile	Glu	
	50					55					60					
agg	atg	gtg	ctt	tcg	gca	ttc	gac	gaa	aga	aga	aac	aag	tat	ctc	gag	240
Arg	Met	Val	Leu	Ser	Ala	Phe	Asp	Glu	Arg	Arg	Asn	Lys	Tyr	Leu	Glu	
65					70					75					80	
gag	cat	ccc	agt	gct	ggg	aaa	gac	cct	aag	aaa	acg	gga	ggc	ccg	ata	288
Glu	His	Pro	Ser	Ala	Gly	Lys	Asp	Pro	Lys	Lys	Thr	Gly	Gly	Pro	Ile	
			85					90						95		
tac	aga	aga	aaa	gat	ggg	aaa	tgg	atg	agg	gaa	ctc	atc	ctc	cat	gat	336
Tyr	Arg	Arg	Lys	Asp	Gly	Lys	Trp	Met	Arg	Glu	Leu	Ile	Leu	His	Asp	
			100					105						110		
aaa	gaa	gaa	atc	atg	aga	atc	tgg	cgt	cag	gcc	aac	aat	ggt	gaa	gac	384
Lys	Glu	Glu	Ile	Met	Arg	Ile	Trp	Arg	Gln	Ala	Asn	Asn	Gly	Glu	Asp	
		115					120						125			
gct	act	gct	ggt	ctt	act	cat	atg	atg	atc	tgg	cac	tcc	aat	ctc	aat	432
Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Thr	His	Met	Met	Ile	Trp	His	Ser	Asn	Leu	Asn	
	130					135					140					
gac	acc	aca	tac	caa	aga	aca	agg	gct	ctt	gtt	cgg	act	ggg	atg	gat	480
Asp	Thr	Thr	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg	Ala	Leu	Val	Arg	Thr	Gly	Met	Asp	
145					150					155					160	
ccc	aga	atg	tgc	tct	ctg	atg	caa	ggc	tca	acc	ctc	cca	cgg	aga	tct	528
Pro	Arg	Met	Cys	Ser	Leu	Met	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Arg	Arg	Ser	
				165				170						175		
gga	gcc	gct	ggt	gct	gca	gta	aaa	ggc	gtt	gga	aca	atg	gta	atg	gaa	576
Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Gly	Val	Gly	Thr	Met	Val	Met	Glu	
			180					185						190		
ctc	atc	aga	atg	atc	aag	cgc	gga	ata	aat	gat	cgg	aat	ttc	tgg	aga	624
Leu	Ile	Arg	Met	Ile	Lys	Arg	Gly	Ile	Asn	Asp	Arg	Asn	Phe	Trp	Arg	
		195					200					205				
ggt	gaa	aat	ggt	cga	aga	acc	aga	att	gct	tat	gaa	aga	atg	tgc	aat	672
Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Arg	Thr	Arg	Ile	Ala	Tyr	Glu	Arg	Met	Cys	Asn	
	210					215					220					
atc	ctc	aaa	ggg	aaa	ttt	cag	aca	gca	gca	caa	cgg	gct	atg	atg	gac	720
Ile	Leu	Lys	Gly	Lys	Phe	Gln	Thr	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Met	Met	Asp	
225					230					235					240	
cag	gtg	agg	gaa	ggc	cgc	aat	cct	gga	aac	gct	gag	att	gag	gat	ctc	768
Gln	Val	Arg	Glu	Gly	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	Ala	Glu	Ile	Glu	Asp	Leu	
				245				250						255		
att	ttc	ttg	gca	cga	tca	gca	ctt	att	ttg	aga	gga	tca	gta	gcc	cat	816
Ile	Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Leu	Arg	Gly	Ser	Val	Ala	His	

ES 2 393 406 T3

260	265	270	
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca cta acc agt ggg Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Leu Thr Ser Gly 275 280 285			864
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe 290 295 300			912
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu 305 310 315 320			960
aac cca gca cac aaa agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala 325 330 335			1008
gca ttt gag gat ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val 340 345 350			1056
atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn 355 360 365			1104
gaa aac atg gag aca ata aat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys 370 375 380			1152
tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg 385 390 395 400			1200
gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg 405 410 415			1248
aat ctt ccc ttt gag aga gca acc att atg gct gca ttc act ggt aac Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn 420 425 430			1296
act gaa gga agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met 435 440 445			1344
gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe 450 455 460			1392
gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp 465 470 475 480			1440
atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe 485 490 495			1488
gac agt taa Asp Ser			1497

<210> 72
<211> 498

ES 2 393 406 T3

<212> PRT
 <213> Virus de la gripe

<400> 72

5

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
 245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Leu Thr Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445

ES 2 393 406 T3

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

Asp Ser

<210> 73
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1413)

10

<400> 73

atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg	48
Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca	96
Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr	
20 25 30	
gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg	144
Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr	
35 40 45	
atc ata aga gaa tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa ctt act caa	192
Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Leu Thr Gln	
50 55 60	
tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa	240
Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu	
65 70 75 80	
tac tac atg aat aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca	288
Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala	
85 90 95	
cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt	336
Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val	
100 105 110	
ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga	384
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg	
115 120 125	

acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac	432
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn	
130 135 140	
ggc aca ata aag gat cga agt ccg tat agg act ttg atg agt gtc aaa	480
Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys	
145 150 155 160	
ata ggg caa tca cct aat gta tat caa gct agg ttt gaa tcg gtg gca	528
Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala	
165 170 175	
tgg tca gca aca gca tgc cat gat gga aaa aaa tgg atg aca gtt gga	576
Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly	
180 185 190	
gtc aca ggg ccc gac aat caa gca att gca gta gtg aac tat gga ggt	624
Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly	
195 200 205	
gtt ccg gtt gat att att aat tca tgg gca ggg gat att tta aga acc	672
Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr	
210 215 220	
caa gaa tca tca tgc acc tgc att aaa gga gac tgt tat tgg gta atg	720
Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met	
225 230 235 240	
act gat gga ccg gca aat agg caa gct aaa tat agg ata ttc aaa gca	768
Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala	
245 250 255	
aaa gat gga aga gta att gga caa act gat ata agt ttc aat ggg gga	816
Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly	
260 265 270	
cac ata gag gag tgt tct tgt tac ccc aat gaa ggg aag gtg gaa tgc	864
His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Glu Gly Lys Val Glu Cys	
275 280 285	
ata tgc agg gac aat tgg act gga aca aat aga cca att ctg gta ata	912
Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Ile Leu Val Ile	
290 295 300	
tct tct gat cta tcg tac aca gtt gga tat ttg tgt gct ggc att ccc	960
Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro	
305 310 315 320	
act gac act cct agg gga gag gat agt caa ttc aca ggc tca tgt aca	1008
Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr	
325 330 335	
agt cct ttg gga aat aaa gga tac ggt gta aaa ggc ttc ggg ttt cga	1056
Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg	
340 345 350	
caa gga act gac gta tgg gcc gga agg aca att agt agg act tca aga	1104
Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg	
355 360 365	

ES 2 393 406 T3

```

tca gga ttc gaa ata ata aaa atc agg aat ggt tgg aca cag aac agt      1152
Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
   370                               375                               380

aag gac caa atc agg agg caa gtg att atc gat gac cca aat tgg tca      1200
Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
385                               390                               395                               400

gga tat agc ggt tct ttc aca ttg ccg gtt gaa ctg aca aaa aag gga      1248
Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
                               405                               410                               415

tgt ttg gtc ccc tgt ttc tgg gtt gaa atg att aga ggt aaa cct gaa      1296
Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
                               420                               425                               430

gaa aca aca ata tgg acc tct agc agc tcc att gtg atg tgt gga gta      1344
Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
                               435                               440                               445

gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc      1392
Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
   450                               455                               460

ttt gac atc gat aag atg taa                                          1413
Phe Asp Ile Asp Lys Met
465                               470

```

<210> 74
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5

<400> 74

```

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1                               5                               10                               15

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20                               25                               30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35                               40                               45

Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Leu Thr Gln
 50                               55                               60

Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65                               70                               75                               80

Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85                               90                               95

```

10

Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
 100 105 110

Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg
 115 120 125

Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
 130 135 140

Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys
 145 150 155 160

Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly
 180 185 190

Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly
 195 200 205

Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr
 210 215 220

Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met
 225 230 235 240

Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala
 245 250 255

Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly
 260 265 270

His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Glu Gly Lys Val Glu Cys
 275 280 285

Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Ile Leu Val Ile
 290 295 300

Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro
 305 310 315 320

Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr
 325 330 335

ES 2 393 406 T3

Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg
 340 345 350

Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
 355 360 365

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380

Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430

Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445

Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460

Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 75
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(756)

10

<400> 75

atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca	48
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro	
1 5 10 15	
tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt	96
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe	
20 25 30	
gcg gga aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca	144
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr	
35 40 45	

aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc	192
Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe	
50 55 60	
acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc	240
Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val	
65 70 75 80	
caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca	288
Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala	
85 90 95	
gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca	336
Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala	
100 105 110	
aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg	384
Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met	
115 120 125	
gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt	432
Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe	
130 135 140	
ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga	480
Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg	
145 150 155 160	
tct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca tta atc aga cat gaa	528
Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu	
165 170 175	
aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg	576
Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met	
180 185 190	
gca gga tgc agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg	624
Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg	
195 200 205	
gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc	672
Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser	
210 215 220	
tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac	720
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr	
225 230 235 240	
cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc	766
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys	
245 250	
gtcattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattot tgatcgtctt	826
ttcttcaaat tcatttatog tcgccttaaa tacggggtga aaagagggcc ttctacggaa	886
ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt	946
gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagta	981

ES 2 393 406 T3

<211> 252
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe

5 <400> 76

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
 65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
 100 105 110

Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
 130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
 145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
 165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg
 195 200 205

ES 2 393 406 T3

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
 210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

<210> 77
 <211> 1698
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 77

atg aag aca acc att att tta ata cta ctg acc cat tgg gcc tac agt	48
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser	
1 5 10 15	
caa aac cca atc agt ggc aat aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac	96
Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His	
20 25 30	
cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca atg agt gat gat caa	144
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln	
35 40 45	
att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg	192
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly	
50 55 60	
aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca	240
Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr	
65 70 75 80	
tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat	288
Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr	
85 90 95	
gag agt tgg gac ctc ttt ata gaa aga agc agc gct ttc agc aat tgc	336
Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys	
100 105 110	
tac cca tat gac atc cct gac tat gca ccg ctc cga toc att gta gca	384
Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Pro Leu Arg Ser Ile Val Ala	
115 120 125	
tcc tca ggg aca gtg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt	432
Ser Ser Gly Thr Val Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly	
130 135 140	
gta act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat	480

ES 2 393 406 T3

Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Arg	Ser	Gly	Ala	Cys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	
145					150					155					160	
agt	ttc	ttt	agc	cga	ctg	aat	tgg	cta	aca	aaa	tct	gga	agc	tct	tac	528
Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	
			165					170						175		
ccc	aca	ttg	aat	gtg	aca	atg	cct	aac	aat	aaa	aat	ttc	gac	aag	cta	576
Pro	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	Lys	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	
			180					185					190			
tac	atc	tgg	ggg	att	cat	cac	ccg	agc	tca	aat	caa	gag	cag	aca	aaa	624
Tyr	Ile	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Ser	Asn	Gln	Glu	Gln	Thr	Lys	
		195					200					205				
ttg	tac	atc	caa	gaa	tca	gga	cga	gta	aca	gtc	tca	aca	aaa	aga	agt	672
Leu	Tyr	Ile	Gln	Glu	Ser	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	
	210					215					220					
caa	caa	aca	ata	atc	cct	aac	atc	gga	tct	aga	ccg	ttg	gtc	aga	ggt	720
Gln	Gln	Thr	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Pro	Leu	Val	Arg	Gly	
225					230					235					240	
caa	tca	ggc	agg	ata	agc	ata	tac	tgg	acc	att	gta	aaa	cct	gga	gat	768
Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	
			245					250						255		
atc	cta	atg	ata	aac	agt	aat	ggc	aac	tta	gtt	gca	ccg	cgg	gga	tat	816
Ile	Leu	Met	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	
			260					265					270			
ttt	aaa	ttg	aac	aca	ggg	aaa	agc	tct	gta	atg	aga	tcc	gat	gta	ccc	864
Phe	Lys	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Ser	Val	Met	Arg	Ser	Asp	Val	Pro	
		275					280					285				
ata	gac	att	tgt	gtg	tct	gaa	tgt	att	aca	cca	aat	gga	agc	atc	tcc	912
Ile	Asp	Ile	Cys	Val	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser	
	290					295					300					
aac	gac	aag	cca	ttc	caa	aat	gtg	aac	aaa	gtt	aca	tat	gga	aaa	tgc	960
Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Val	Thr	Tyr	Gly	Lys	Cys	
305					310					315					320	
ccc	aag	tat	atc	agg	caa	aac	act	tta	aag	ctg	gcc	act	ggg	atg	agg	1008
Pro	Lys	Tyr	Ile	Arg	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	
				325						330				335		
aat	gta	cca	gaa	aag	caa	acc	aga	gga	atc	ttt	gga	gca	ata	gcg	gga	1056
Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	
			340					345					350			
ttc	atc	gaa	aac	ggc	tgg	gaa	gga	atg	gtt	gat	ggg	tgg	tat	ggg	ttc	1104
Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	
		355					360					365				
cga	tat	caa	aac	tct	gaa	gga	aca	ggg	caa	gct	gca	gat	cta	aag	agc	1152
Arg	Tyr	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	
	370					375					380					
act	caa	gca	gcc	atc	gac	cag	att	aat	gga	aag	tta	aac	aga	gtg	att	1200

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400
 gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa 1248
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415
 gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa 1296
 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430
 ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat 1344
 Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445
 caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag 1392
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460
 aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga 1440
 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475
 tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gaa tca ata 1488
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile
 485 490 495
 aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aaa gat gaa gca tta aac 1536
 Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510
 aat cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat 1584
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525
 tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 1632
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540
 gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aaa ggc aac atc aga 1680
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560
 tgc aac att tgc att tga 1698
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 78
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 <400> 78

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His

5

10

ES 2 393 406 T3

	20		25		30										
His	Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Lys	Thr	Met	Ser	Asp	Asp	Gln
	35						40					45			
Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Val	Gln	Ser	Ile	Ser	Met	Gly
	50					55					60				
Lys	Ile	Cys	Asn	Lys	Ser	Tyr	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Arg	Asn	Cys	Thr
65					70					75					80
Leu	Ile	Asp	Ala	Met	Leu	Gly	Asp	Pro	His	Cys	Asp	Ala	Phe	Gln	Tyr
				85					90					95	
Glu	Ser	Trp	Asp	Leu	Phe	Ile	Glu	Arg	Ser	Ser	Ala	Phe	Ser	Asn	Cys
			100					105						110	
Tyr	Pro	Tyr	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Arg	Ser	Ile	Val	Ala
		115					120						125		
Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Gly	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly
	130					135					140				
Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Arg	Ser	Gly	Ala	Cys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp
145					150					155					160
Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr
				165					170						175
Pro	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	Lys	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu
			180					185						190	
Tyr	Ile	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Ser	Asn	Gln	Glu	Gln	Thr	Lys
		195					200					205			
Leu	Tyr	Ile	Gln	Glu	Ser	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser
	210					215					220				
Gln	Gln	Thr	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Pro	Leu	Val	Arg	Gly
225					230					235					240
Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp
				245					250					255	
Ile	Leu	Met	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr

ES 2 393 406 T3

			260					265					270		
Phe	Lys	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Ser	Val	Met	Arg	Ser	Asp	Val	Pro
		275					280					285			
Ile	Asp	Ile	Cys	Val	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser
	290					295					300				
Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Val	Thr	Tyr	Gly	Lys	Cys
305					310					315					320
Pro	Lys	Tyr	Ile	Arg	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg
				325					330						335
Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly
			340					345					350		
Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe
		355					360					365			
Arg	Tyr	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser
	370					375						380			
Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Val	Ile
385					390					395					400
Glu	Arg	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu
				405					410						415
Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys	Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys
			420					425					430		
Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn
		435					440					445			
Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Met	Asn	Lys	Leu	Phe	Glu
	450					455					460				
Lys	Thr	Arg	Arg	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Glu	Asp	Met	Gly	Gly	Gly
465					470					475					480
Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Ala	Cys	Ile	Glu	Ser	Ile
				485					490					495	
Arg	Thr	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn

ES 2 393 406 T3

	500		505		510											
	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp
			515					520					525			
	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser	Cys	Phe	Leu	Ile	Cys	Val
			530				535					540				
	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys	Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg
	545					550					555					560
	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile											
					565											

5 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

10 <400> 79
 tatgcatcgc tccgatccat 20

15 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

20 <400> 80
 gctccacttc ttccgttttg a 21

25 <210> 81
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

30 <400> 81
 aattcacagc agagggattc acatggacag 30

35 <210> 82.
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

40 <220>
 <221> variación
 <222> (7).. (7)
 <223> r = a o g

45 <400> 82
 catggartgg ctaaagacaa gacc 24

50 <210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe

55 <220>
 <221> variación
 <222> (18)..(18)
 <223> k = g o t

ES 2 393 406 T3

<400> 83
 agggcatttt ggacaaakcg tcta 24
 5 <210> 84
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe
 <400> 84
 10 acgctcaccg tgcccagt 18
 <210> 85
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Virus de la gripe
 <400> 85
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggg 28
 20 <210> 86
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe
 25 <400> 86
 tgtaatacga ctactatag ggctccactt ctccgtttt ga 42
 <210> 87
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Virus de la gripe
 <400> 87
 gatcgtcttt caggagcaaa aagcaggtag 30
 35 <210> 88
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la gripe
 40 <400> 88
 tgtaatacga ctactatag ggcattttgg acaaagcgtc 40

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la gripe canina aislado que es capaz de infectar a un animal cánido, en el que dicho virus de la gripe comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de hemaglutinina (HA) que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 78, o una secuencia madura del mismo en la que se ha retirado la secuencia señal de 16 aminoácidos N terminal de la secuencia de longitud completa.
2. El virus de la gripe de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho virus de la gripe comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76.
3. El virus de la gripe de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido HA de dicho aislado viral comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 78.
4. El virus de la gripe de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho virus de la gripe comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, o dicho polinucleótido tiene 98% o más de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77.
5. El virus de la gripe de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho virus de la gripe está inactivado o atenuado.
6. Una composición que comprende un inmunógeno de un virus de la gripe de la reivindicación 1, en la que dicho inmunógeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe que es capaz de infectar a un animal cánido, y en la que dicho inmunógeno comprende:
- (a) un polipéptido HA como se ha definido en la reivindicación 1 o reivindicación 3, y/o
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido HA como se ha definido en la reivindicación 1 o reivindicación 3.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho inmunógeno comprende virus completo sin células, o una parte del mismo; un polinucleótido viral; una proteína viral, un polipéptido o péptido viral; una célula infectada por virus; una construcción basada en vector viral recombinante; un virus redistribuido; o ácido nucleico desnudo de dicho virus.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha proteína, polipéptido o péptido viral comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene un 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho polinucleótido viral codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene un 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 64, 66, 68, 70, 72, 74 o 76.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho polinucleótido viral comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de SEC ID N°: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75 o 77, o un fragmento funcional de la misma.
11. Una vacuna de gripe canina, en la que la vacuna comprende:
- una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno de al menos un virus de la gripe de la reivindicación 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho antígeno comprende:
- (a) un polipéptido de HA como se ha definido en la reivindicación 1 o reivindicación 3, y/o
- (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido de HA como se ha definido en la reivindicación 1 o reivindicación 3.
12. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el antígeno o los antígenos virales comprenden uno o varios virus inactivados.
13. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el antígeno o los antígenos virales comprenden uno o varios virus atenuados vivos.

14. Un polinucleótido aislado que comprende todo o parte de un segmento genómico o gen de un virus de la gripe de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de HA como se ha definido en la reivindicación 1 o reivindicación 3.
- 5 15. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho polinucleótido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
16. Una construcción de expresión polinucleotídica que comprende un polinucleótido de la reivindicación 14.
- 10 17. Un polipéptido de HA aislado codificado por un polinucleótido de la reivindicación 14.
18. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho polipéptido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

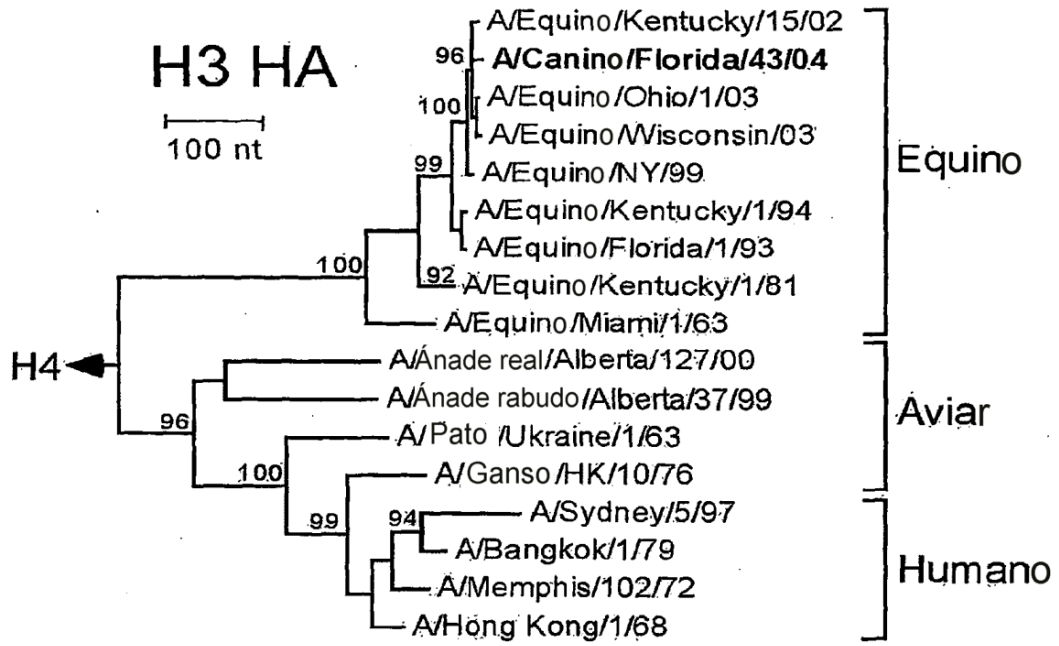


FIG. 1A

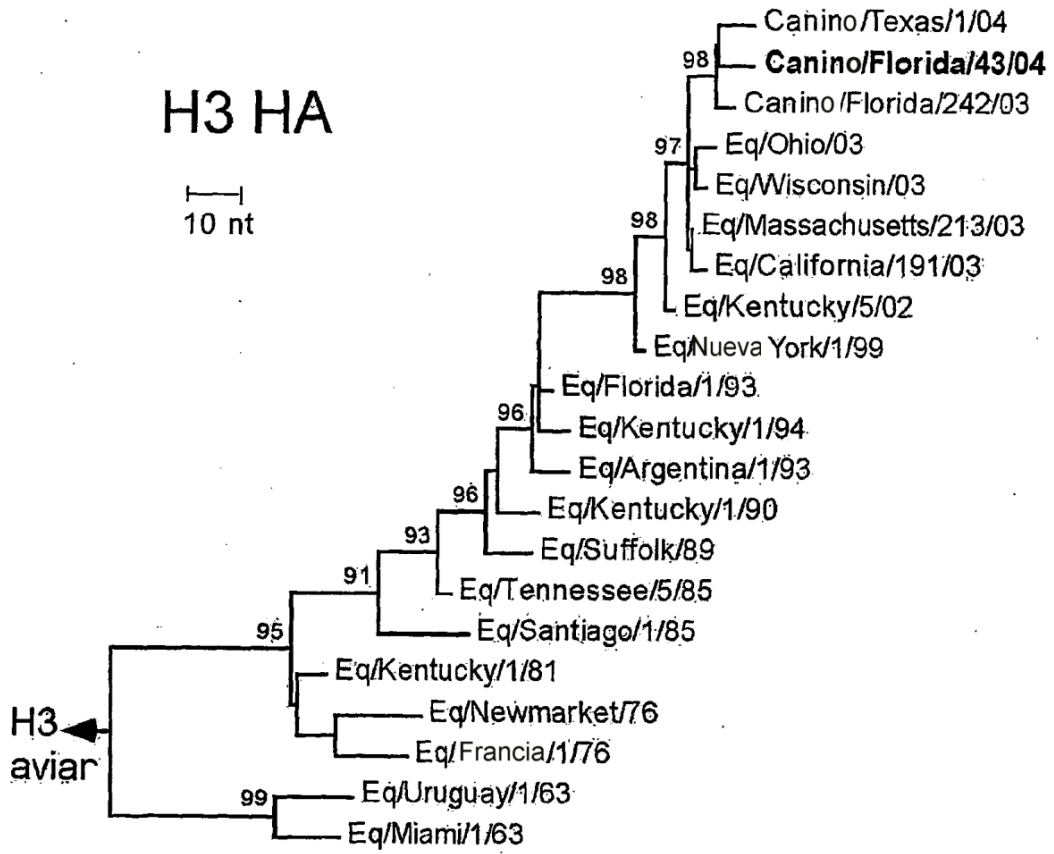


FIG. 1B

FIG. 2A

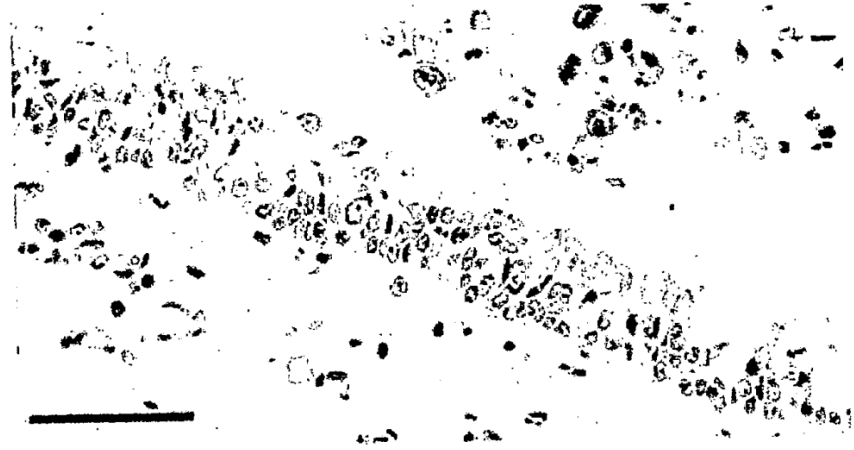
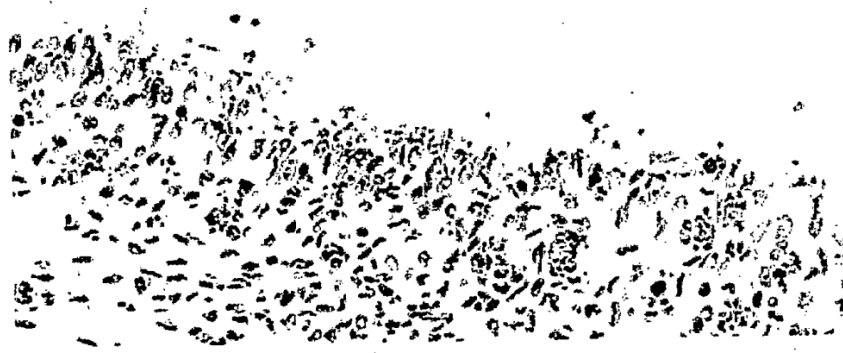


FIG. 2B



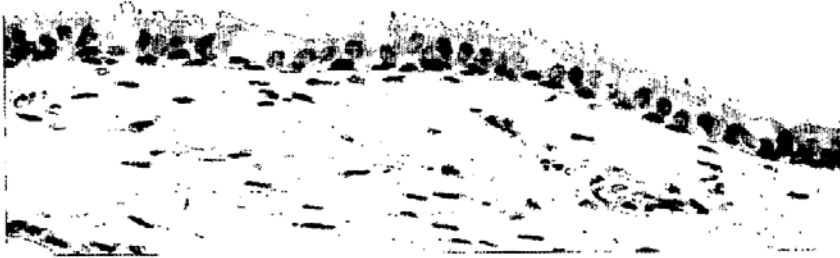


FIG. 3A

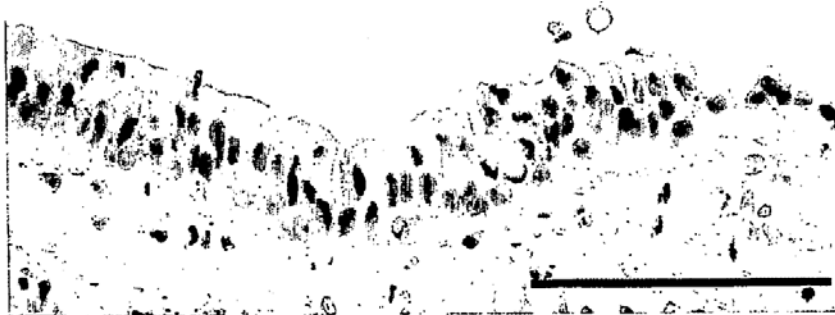


FIG. 3B

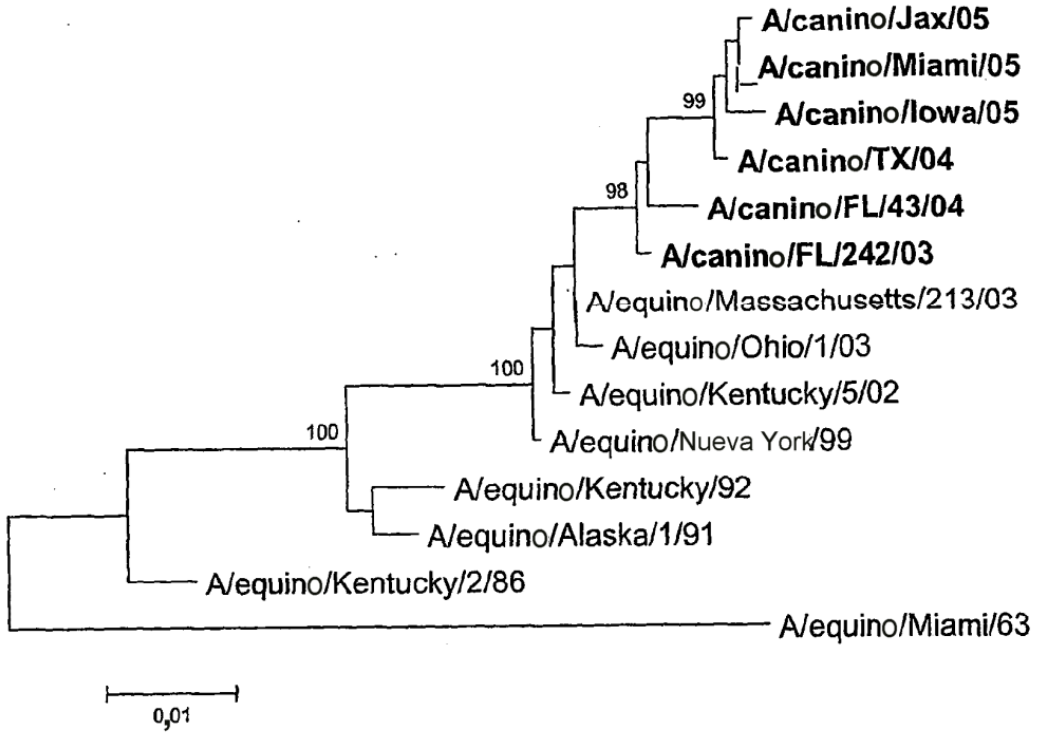


FIG. 4A

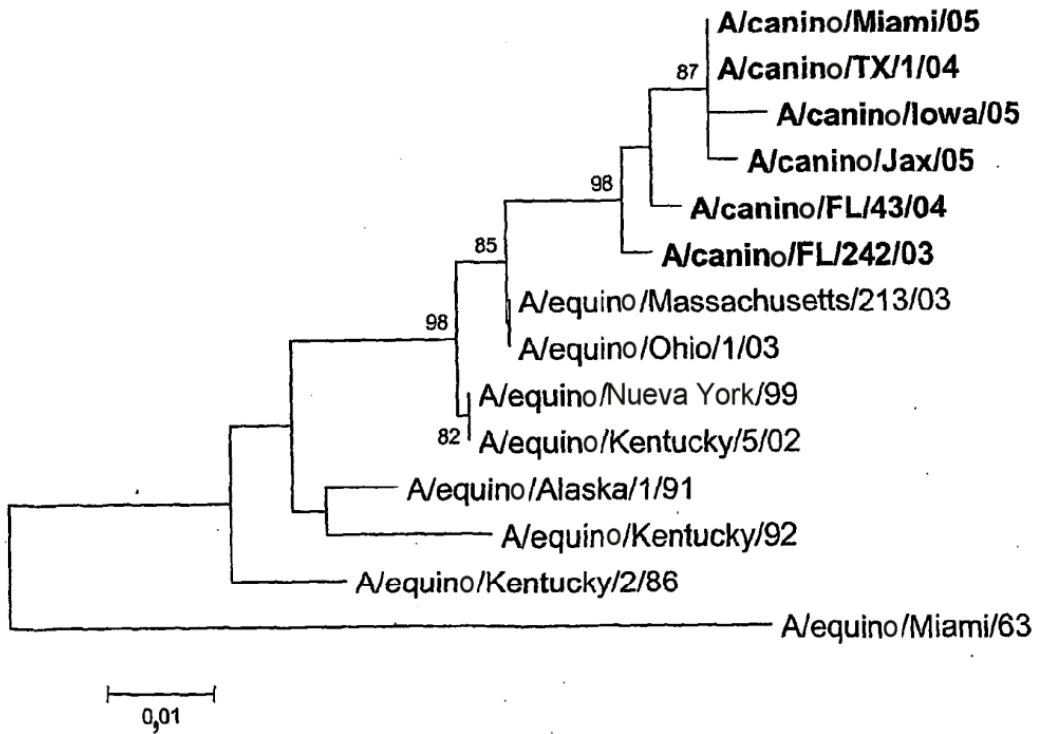


FIG. 4B

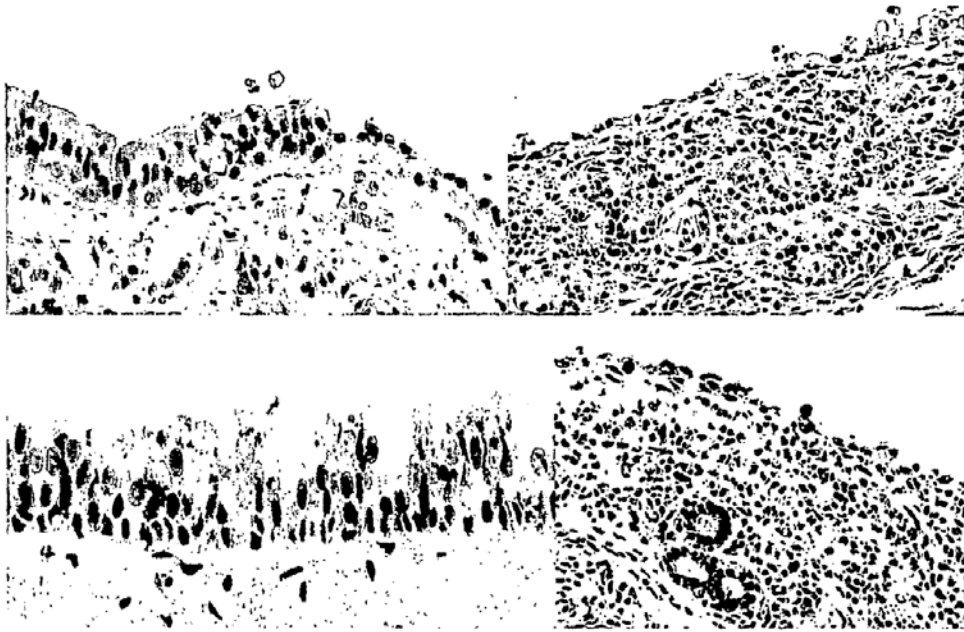


FIG. 5

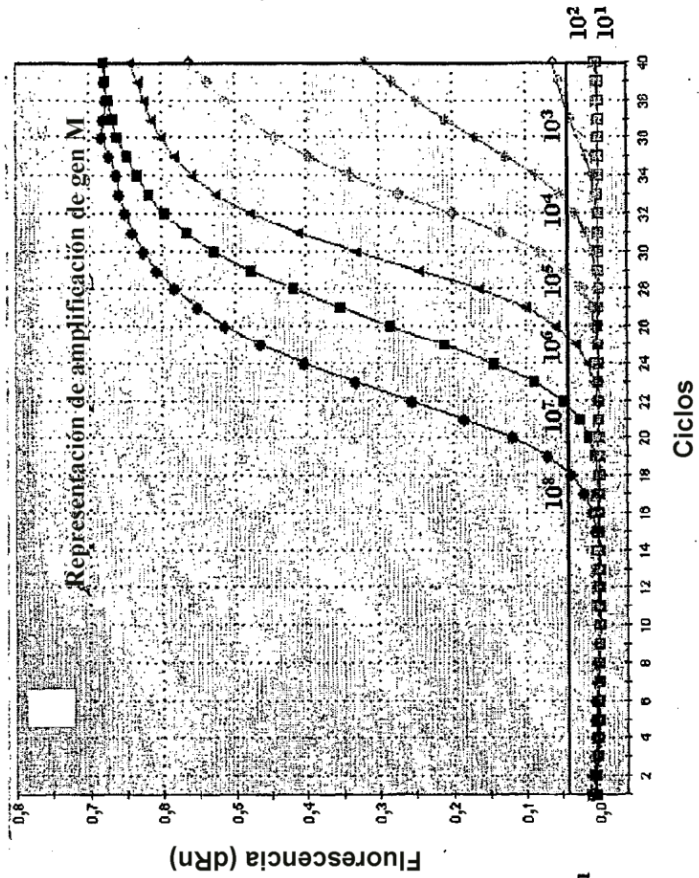


FIG. 6B

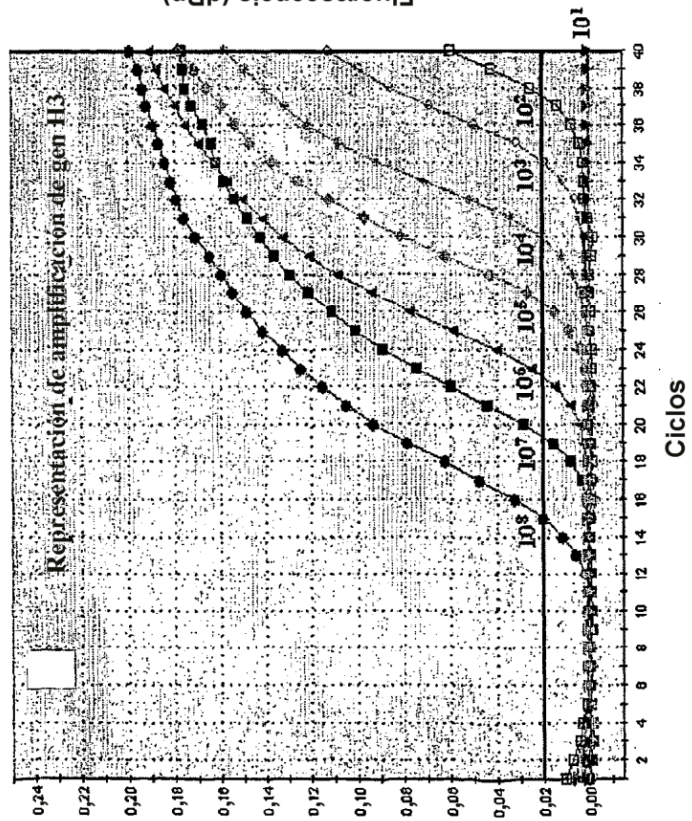


FIG. 6A

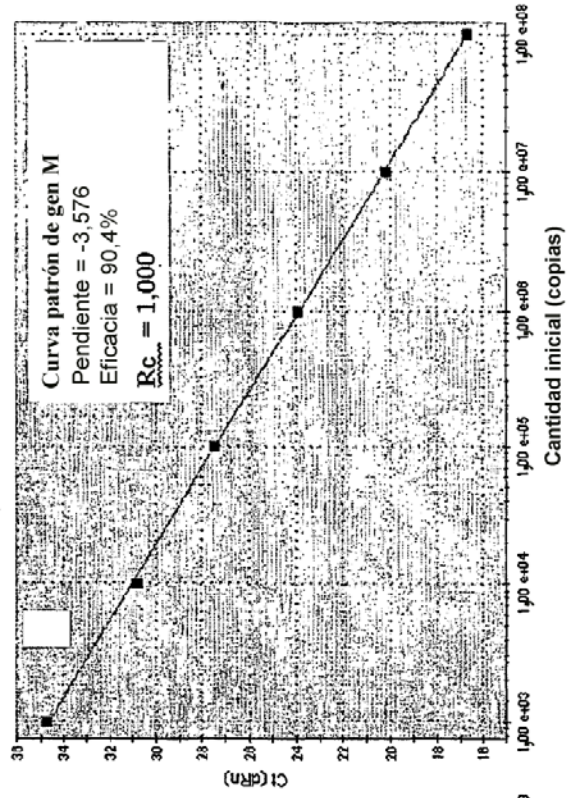


FIG. 6D

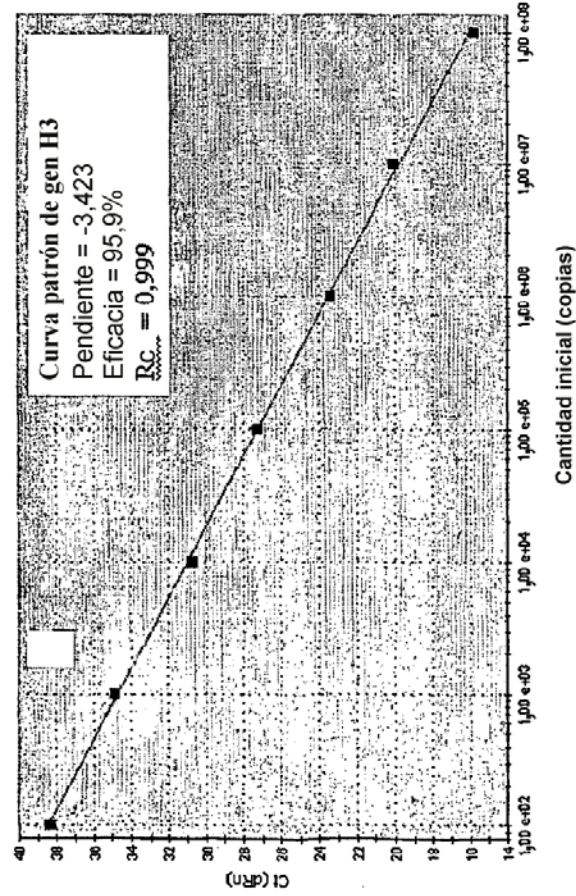


FIG. 6C

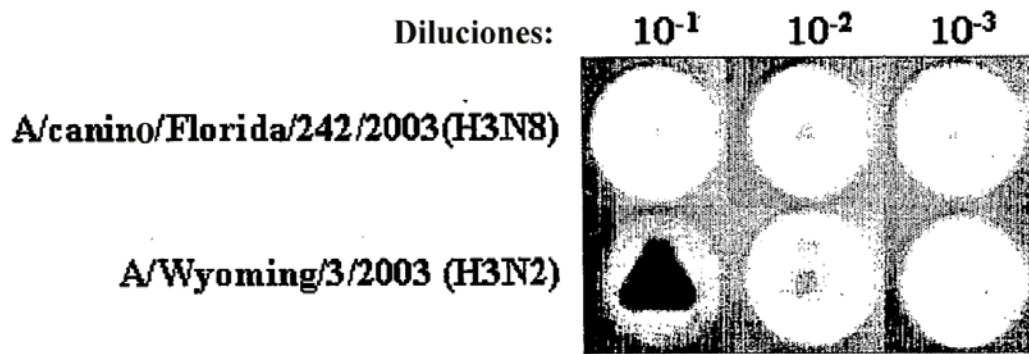


FIG. 7