

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 315**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2006 E 11003016 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2407480**

54 Título: **Materiales para el control de la enfermedad respiratoria en caninos**

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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.09.2014**

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 2 496 315 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

Materiales para el control de la enfermedad respiratoria en caninos

## 5 Antecedentes de la Invención

La “tos de las perreras” o traqueobronquitis infecciosa (ITB) es una infección respiratoria aguda, contagiosa de los perros que se caracteriza principalmente por tos (Ford y col, 1998). La ITB canina se considera una de las enfermedades respiratorias infecciosas más prevalente en perros de todo el mundo, los brotes pueden alcanzar proporciones epidémicas cuando los perros se alojan en sitios con alta densidad de población como son las perreras. La mayoría de los brotes se deben al contacto directo perro a perro o a la aerosolización de las secreciones respiratorias (Ford y col, 1998). Los signos clínicos se producen por la infección con uno o una combinación de agentes bacterianos y víricos que colonizan el epitelio del tracto respiratorio superior e inferior. Los organismos aislados más comunes de los perros afectados son virus de la parainfluenza canina (CPIV) y *Bordetella bronchiseptica*, pero otros varios virus tales como el virus del moquillo canino (CDV) y adenovirus canino-1 y 2 (CAV-1, CAV-2), junto con bacterias tales como *Streptococcus sp.*, *Pasteurella multocida* y *Escherichia coli*, pueden tener alguna influencia en el curso clínico y en el resultado (Ford y col, 1998). Aunque los brotes se producen con más eficacia y rápidamente en poblaciones con alta densidad con alta morbilidad, las infecciones respiratorias complicadas y la muerte son poco comunes. Aunque se pueden producir neumonías secundarias que pongan en peligro la vida, la mayoría de los casos de ITB son autolimitantes y se resuelven sin tratamiento (Ford y col, 1998).

En julio de 1992, se produjo una infección respiratoria que se presumió como “tos de las perreras que llegó a ser epidémica en varios canódromos de galgos Greyhounds en Nueva Inglaterra, Florida, Virginia del Oeste, Wisconsin, Kansas, Colorado, Oklahoma y Arizona. Según los veterinarios, la mayoría de los perros afectados tenía una tos ligera que se resolvió, pero más de una docena de galgos Greyhounds desarrolló una neumonía hemorrágica aguda seguida de una muerte rápida (Greyhound Daily News, 1999).

De finales de 1998 a principios de 1999, se produjeron varios brotes de “tos de las perreras” en las perreras de galgos Greyhounds de carreras por todo el país, lo que resultó en la orden de clausura de los canódromos y la cuarentena de todos los galgos Greyhounds de carreras en los EE. UU. durante varias semanas (Greyhound Daily News, 1999). En un canódromo de Florida (Palm Beach Kennel Club), la tos se registró en cerca del 40% de la población de perros en un solo día (comunicación personal del Dr. William Duggar). Al igual que en el brote de 1992, la tos se resolvió en la mayoría de los galgos Greyhounds, pero 10 perros murieron en Florida 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 de galgos Greyhounds en el este de los EE. UU. Se cree que el brote se originó en las perreras de cuatro canódromos de Florida y produjo la suspensión de las carreras y la cuarentena de los perros durante casi tres semanas. Cerca del 25% de los perros en el canódromo de West Palm Beach estaban afectados, mientras que casi el 50% de los 1.400 perros del Derby Lane en San Petersburgo desarrollaron tos. De nuevo, la mayoría de los perros se recuperaron, pero varios perros murieron de la infección respiratoria. El impacto económico estimado del brote respiratorio en el canódromo Derby Lane solo fue de 2 millones de dólares.

No se han publicado informes documentando la etiología o la clinicopatología de las epidemias de “tos de las perreras” en las perreras de galgos Greyhounds de carreras de 1992, 1998-1999, o 2003. Se ha asumido que las infecciones se debieron a CPIV y/o *B. bronchiseptica*, las dos causas más comunes de tos de las perreras. Algunas comunicaciones insustanciales tales como páginas de internet han atribuido las neumonías hemorrágicas fatales comunicadas en algunos perros de la tos a infecciones por *Streptococcus equi* β-hemolíticos subespecie *zooepidemicus*, y se refieren al síndrome como “choque tóxico estreptocócico canino”.

La transmisión de virus de una especie huésped a otra es una característica crucial de la ecología y epidemiología del virus de la influenza (Webster, 1998). Son posibles dos mecanismos básicos de la transmisión interespecies (Webster y col., 1992; Lipatov y col., 2004). Uno es la transferencia directa de un virus esencialmente sin alterar de una especie a otra. Ejemplos de este mecanismo incluye las recientes infecciones humanas con el subtipo H5N1 del virus de la influenza aviar (Subbarao y col., 1998; Peiris y col., 2004; Guan y col., 2004) y posiblemente la pandemia de 1918, conocida como gripe española (Reid y col., 2004). El segundo mecanismo es consecuencia de la naturaleza segmentada del genoma de la influenza. La co-infección de un huésped con virus de diferentes especies puede dar lugar a una combinación de los genes segmentados víricos y la generación de un recombinante con la capacidad de infectar otras especies. Por ejemplo, los nuevos virus generados por combinación genética entre los virus de la influenza aviares y humanos dio como resultado la pandemia de influenza humana de 1957 y 1968 (Webster y col., 1992; Lipatov y col., 2004; Kawaoka y col., 1989).

La mayoría de transmisiones directas de virus de la influenza sin modificar de la especie huésped natural a una especie diferente son acontecimientos terminales debido a que la transmisión sostenida entre individuos de la nueva especie no se produce. Son necesarias las interacciones de huésped - múltiples virus para la replicación y la transmisión horizontal y proporciona una barrera formidable a la perpetuación de los virus de la influenza en el nuevo

huésped (Webby y col., 2004). Por lo tanto, el establecimiento de nuevos linajes de virus específicos de huésped de la influenza es poco común y solo ha ocurrido en aves domésticas, cerdos, caballos y seres humanos (Webster y col., 1992; Lipatov y col., 2004).

- 5 Debido a la naturaleza grave de la infección por virus de influenza, sigue habiendo una necesidad de métodos para diagnosticar, prevenir y tratar la infección por virus de la influenza.

#### Breve resumen de la Invención

- 10 El objetivo de la invención se refiere a un virus de la influenza aislado que es capaz de infectar a cánidos y producir enfermedad respiratoria en los cánidos.

La invención es la siguiente:

- 15 1. Un virus de influenza canina aislado que es capaz de infectar un animal cánido, donde dicho virus de influenza comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido hemaglutinina (HA) que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 62, o una secuencia madura del mismo donde se ha retirado la secuencia de señal de 16 aminoácidos del extremo N de la secuencia de longitud total.

- 20 2. El virus de la influenza de acuerdo con el punto 1, donde dicho virus de la influenza comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 95% o más con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60.

- 25 3. El virus de la influenza del punto 1, donde dicho polipéptido HA de dicho aislado vírico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 62.

- 30 4. El virus de la influenza de acuerdo con el punto 1, donde dicho virus de la influenza comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61, o dicho polinucleótido tiene una identidad de secuencia del 98% o más con la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, o 61.

- 35 5. El virus de la influenza del punto 1, donde dicho virus de la influenza está inactivado o atenuado.

6. Una composición que comprende un inmunógeno de un virus de la influenza del punto 1, donde dicho inmunógeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la influenza que es capaz de infectar un animal cánido, y donde dicho inmunógeno comprende:

- 40 (a) un polipéptido HA como se define en el punto 1 y el punto 3; y/o  
(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido HA como se define en el punto 1 o el punto 3.

- 45 7. La composición de acuerdo con el punto 6, donde dicho inmunógeno comprende un virus completo libre de célula, una parte del mismo; un polinucleótido vírico; una proteína vírica; un polipéptido o péptido vírico; una célula infectada por el virus; una construcción basada en un vector vírico recombinante; un virus combinado; un ácido nucleico desnudo de dicho virus.

- 50 8. La composición de acuerdo con el punto 7, donde dicha proteína vírica, polipéptido, o péptido comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 95% o más con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o donde dicho polinucleótido vírico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o un fragmento funcional y/o inmunógeno de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 95% o más con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o donde dicho polinucleótido vírico comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61, o un fragmento funcional de la misma.

- 60 9. Una vacuna para la influenza canina, donde la vacuna comprende:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno de al menos un virus de la influenza del punto 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable,  
donde dicho antígeno comprende:

- 65 (a) un polipéptido HA como se define en el punto 1 o el punto 3; y/o

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido HA como se define en el punto 1 o el punto 3.

10. La vacuna de acuerdo con el punto 9, donde el antígeno vírico comprende un virus inactivado o un virus vivo atenuado.

11. Un polinucleótido aislado que comprende todo o parte de un segmento genómico o gen de un virus de la influenza del punto 1, donde el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido HA como se define en el punto 1 o el punto 3.

12. El polinucleótido de acuerdo con el punto 11, donde dicho polinucleótido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. Una construcción de expresión de un polinucleótido que comprende un polinucleótido del punto 11.

14. Un polipéptido HA aislado codificado por un polinucleótido del punto 11.

15. El polipéptido de acuerdo con el punto 14, donde dicho polipéptido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

## Breve descripción de los dibujos

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

Las **Figuras 2A-2B** muestran la detección inmunohistoquímica del antígeno de influenza H3 en los pulmones. Se sondearon secciones de tejidos pulmonares con un anticuerpo monoclonal de ratón para hemaglutinina H3 y se detectaba su unión por la reacción de la inmunoperoxidasa (precipitado marrón). La **Figura 2A** muestra el epitelio bronquial de un galgo Greyhound con enfermedad espontánea. Se detectó el antígeno vírico H3 en el citoplasma celular del epitelio bronquial en los macrófagos de la luz de las vías aéreas y en los espacios alveolares. La **Figura 2B** muestra el epitelio bronquial de un perro 5 días tras la inoculación con A/canine/Florida/ 43/2004 (H3N8). Se detectó el antígeno H3 en el citoplasma celular del epitelio bronquial. Escala de la barra, 66  $\mu\text{m}$ .

La **Figura 3** muestra los cambios histológicos característicos en los bronquios de galgos Greyhounds que murieron de la neumonía hemorrágica asociada con la infección del virus de la influenza. Los tejidos se tiñeron con H/E. Panel superior: bronquio normal con células epiteliales ciliadas, células mucosas, y células basales. Panel inferior: Bronquio de un galgo Greyhound con influenza espontánea. Hay necrosis y erosión de las células epiteliales bronquiales ciliadas. Escala de la barra, 100  $\mu\text{m}$ .

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

La **Figura 5** muestra la proteína H3 del virus de la influenza en las células epiteliales de los bronquios y las glándulas bronquiales en pulmones de perros que murieron por la neumonía asociada a la infección por virus de la influenza. Paneles superiores: Erosión de las células ciliadas del epitelio bronquial en los bronquios. Los tejidos se tiñeron con H/E. Paneles inferiores: Proteína H3 del virus de la influenza en el citoplasma de las células epiteliales de los bronquios (izquierda) y de las glándulas bronquiales (derecha). Los tejidos se tiñeron con un anticuerpo monoclonal contra la H3 de influenza detectado por la reacción de inmunoperoxidasa (precipitado marrón) y contra-teñido con hematoxilina.

Las **Figuras 6A-6D** muestran los gráficos de amplificación de H3 y Matriz de genes (**Figura 6A** y **Figura 6B**) obtenidas de la amplificación de ARN de referencia transcritas *in vitro* diluidas 10 veces en serie. Las curvas de referencia de H3 y Matrices de genes (**Figura 6C** y **Figura 6D**) se construyen trazando el log de partida de concentraciones de ARN contra el umbral del ciclo (Ct) obtenido de cada dilución.

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

## Breve descripción de las secuencias

**SEC ID N° 1** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína PB2.

**SEC ID N° 2** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 1.

- SEC ID N° 3** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína PB1.
- SEC ID N° 4** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 3.
- 5 **SEC ID N° 5** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína PA.
- SEC ID N° 6** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 5
- SEC ID N° 7** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína NS.
- 10 **SEC ID N° 8** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 7
- SEC ID N° 9** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína NP.
- SEC ID N° 10** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 9
- SEC ID N° 11** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína NA.
- 15 **SEC ID N° 12** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 11
- SEC ID N° 13** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína MA.
- SEC ID N° 14** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 13
- 20 **SEC ID N° 15** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Florida/43/04) que codifica la proteína HA.
- SEC ID N° 16** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 15.
- SEC ID N° 17** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína PB2.
- 25 **SEC ID N° 18** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 17.
- SEC ID N° 19** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína PB1.
- SEC ID N° 20** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 19.
- SEC ID N° 21** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína PA
- 30 **SEC ID N° 22** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 21.
- SEC ID N° 23** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína NS.
- SEC ID N° 24** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 23.
- 35 **SEC ID N° 25** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína NP.
- SEC ID N° 26** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 25.
- SEC ID N° 27** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína NA.
- 40 **SEC ID N° 28** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 27.
- SEC ID N° 29** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína MA.
- SEC ID N° 30** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 29.
- 45 **SEC ID N° 31** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (FL/242/03) que codifica la proteína HA.
- SEC ID N° 32** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 31.
- SEC ID N° 33** es la forma madura de la proteína HA mostrada en la SEC ID N° 16 donde se ha retirado la secuencia de señal de 16 aminoácidos en el extremo N.
- SEC ID N° 34** es la forma madura de la proteína HA mostrada en la SEC ID N° 32 donde se ha retirado la secuencia de señal de 16 aminoácidos en el extremo N.
- 50 **SEC ID N° 35** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 36** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 37** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 38** es un oligonucleótido.
- 55 **SEC ID N° 39** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 41** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 42** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 43** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 44** es un oligonucleótido.
- 60 **SEC ID N° 45** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 46** es un oligonucleótido.
- SEC ID N° 47** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína PB2 que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.
- SEC ID N° 48** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 47.
- 65 **SEC ID N° 49** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína PB1 que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.
- SEC ID N° 50** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 49.

**SEC ID N° 51** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína PA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 52** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 51.

5 **SEC ID N° 53** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína NS que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 54** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 53.

**SEC ID N° 55** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína NP que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 56** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 55.

10 **SEC ID N° 57** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína NA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 58** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 57.

**SEC ID N° 59** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína MA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

15 **SEC ID N° 60** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 59.

**SEC ID N° 61** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Miami/2005) que codifica una proteína HA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 62** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 61.

20 **SEC ID N° 63** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína PB2 que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 64** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 63.

**SEC ID N° 65** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína PB1 que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 66** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 65.

25 **SEC ID N° 67** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína PA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 68** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 67.

**SEC ID N° 69** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína NS que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

30 **SEC ID N° 70** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 69.

**SEC ID N° 71** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína NP que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 72** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 71.

35 **SEC ID N° 73** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína NA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 74** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 73.

**SEC ID N° 75** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína MA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 76** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 75.

40 **SEC ID N° 77** es una secuencia de nucleótidos de un virus de la influenza canino (Jacksonville/2005) que codifica una proteína HA que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención.

**SEC ID N° 78** es la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 77.

**SEC ID N° 79** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 80** es un oligonucleótido.

45 **SEC ID N° 81** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 82** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 83** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 84** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 85** es un oligonucleótido.

50 **SEC ID N° 86** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 87** es un oligonucleótido.

**SEC ID N° 88** es un oligonucleótido.

### Divulgación detallada de la invención

55 La presente divulgación se refiere a un virus de influenza aislado que es capaz de infectar cánidos y producirles una enfermedad respiratoria. Un virus de la influenza puede comprender un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 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 o variante funcional y/o inmunogénico de la misma. El polinucleótido puede comprender la secuencia de nucleótido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 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 influenza puede tener un subtipo HA: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, y H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, o H16 o un subtipo NA: N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, o N9. El virus de la influenza puede ser un subtipo H3. El virus se puede aislar de 65 perros infectados y se cultiva en células o embrión de pollo según los métodos descritos en el presente documento. El virus de la influenza puede ser un virus de la influenza A.

La divulgación también se refiere a polinucleótidos que comprenden todo o parte de un gen o genes de un segmento genómico de un virus de la influenza de la presente invención. Un polinucleótido puede comprender un gen hemaglutinina de la influenza (HA), un gen de la neuraminidasa (NA), un gen de nucleoproteína (NP), un gen de proteína de la matriz (MA o M), un gen de proteína polimerasa básica (PB), un gen de proteína polimerasa ácida (PA), un 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 la hemaglutinina (HA). En la divulgación el gen HA codifica una proteína hemaglutinina que tiene uno o más de lo siguiente: 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 de consenso equina. En una divulgación, el gen HA codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 16, 32, 62, o 78, o un fragmento o variante funcional y/o inmunogénico de la misma. En la divulgación, el gen HA comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 15, 31, 61, o 77.

En la divulgación, un polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 o variante funcional y/o inmunogénico de la misma. En la divulgación, el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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, comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N<sup>os</sup> 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 y/o inmunogénico de la misma de cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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. La divulgación se refiere a secuencias de polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos que se muestran en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 las SEC ID N<sup>os</sup> 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. En la divulgación, un polinucleótido puede comprender: los Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N<sup>o</sup> 3; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N<sup>o</sup> 5; Nucleótidos 1-657 de la SEC ID N<sup>o</sup> 7; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N<sup>o</sup> 9; Nucleótidos 1-1410 de la SEC ID N<sup>o</sup> 11; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N<sup>o</sup> 13; Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N<sup>o</sup> 15; Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N<sup>o</sup> 19; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N<sup>o</sup> 21; Nucleótidos 1-657 de la SEC ID N<sup>o</sup> 23; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N<sup>o</sup> 25; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N<sup>o</sup> 29; Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N<sup>o</sup> 31; Nucleótidos 1-2277 de la SEC ID N<sup>o</sup> 47; Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N<sup>o</sup> 49; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N<sup>o</sup> 51; Nucleótidos 1-690 de la SEC ID N<sup>o</sup> 53; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N<sup>o</sup> 55; Nucleótidos 1-1410 de la SEC ID N<sup>o</sup> 57; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N<sup>o</sup> 59; Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N<sup>o</sup> 61; Nucleótidos 1-2277 de la SEC ID N<sup>o</sup> 63; Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N<sup>o</sup> 65; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N<sup>o</sup> 67; Nucleótidos 1-690 de la SEC ID N<sup>o</sup> 69; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N<sup>o</sup> 71; Nucleótidos 1-1410 de la SEC ID N<sup>o</sup> 73; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N<sup>o</sup> 75; y Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N<sup>o</sup> 77. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias víricas de nucleótidos y aminoácidos contempladas en la divulgación también se han depositado en el GenBank con los números de registro DQ124147 hasta DQ124161 y DQ124190.

La divulgación también se refiere a polipéptidos codificados por polinucleótidos de un virus de la influenza. La divulgación también se refiere a fragmentos y variantes funcionales y/o inmunogénicos de los polipéptidos objetivo. Los polipéptidos contemplados incluyen proteína HA, proteína NA, proteína NS, nucleoproteína, proteína polimerasa básica, proteína polimerasa ácida y proteína de la matriz de un virus de la influenza. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 o variante funcional y/o inmunogénico.

La divulgación también se refiere a la construcción de expresión de polinucleótidos que comprenden una secuencia de polinucleótidos. Una construcción de expresión puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 o variante funcional y/o inmunogénico. El polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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 que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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 y/o inmunogénico de cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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. La divulgación se refiere a construcciones de expresión que comprenden una secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 que incluye una variante degenerada, de cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 proporciona la sobre-expresión de un polinucleótido unido operativamente.

- Las construcciones de expresión generalmente incluyen elementos reguladores que son funcionales en la célula huésped en la que se pretende que se exprese la construcción de expresión. Por lo tanto, un experto en la técnica puede seleccionar elementos reguladores para su uso, por ejemplo, en células huésped humanas, células huésped de mamíferos, células huésped de insectos, células huésped de levaduras, células huésped bacterianas, y células huésped vegetales. En una realización, los elementos reguladores 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 utiliza en el presente documento, la expresión "construcción de expresión" se refiere a una combinación de secuencias de ácido nucleico que proporciona la transcripción de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "unida operativamente" se refiere a una yuxtaposición de los componentes descritos en donde los componentes están en una relación que les permite funcionar de la manera que se pretende. En general, los componentes unidos operativamente están en relación de contigüidad.
- Una construcción de expresión puede comprender una secuencia promotora unida operativamente a una secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención. Los promotores se pueden incorporar en un polinucleótido utilizando técnicas de referencia conocidas en la técnica. Se pueden utilizar múltiples copias de promotores o múltiples promotores en una construcción de expresión de la invención. En una realización preferida, un promotor se puede posicionar aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción en la construcción de expresión que está del sitio de transcripción en su entorno genético natural. Se permite alguna variación en esta distancia sin que haya una disminución sustancial de la actividad promotora. Un sitio de inicio de la transcripción está típicamente incluido en la construcción de expresión. Preferentemente, el promotor asociado con una construcción de expresión de la invención proporciona la sobre-expresión de un polinucleótido unido operativamente de la invención.
- Los promotores para su uso con una construcción de expresión de la invención en células eucariotas pueden ser de origen vírico o celular. Los promotores víricos incluyen, pero no se limitan a estos, promotores genéticos de citomegalovirus (CMV), promotores tempranos o tardíos SV40, o promotores genéticos del virus del sarcoma de Rous (RSV). Los promotores de origen celular incluyen pero no se limitan a estos, promotor genético desmina y promotor genético actina. Los promotores adecuados para su uso en una construcción de expresión de la invención en células de levaduras incluyen, pero no se limitan a estos, promotor 3-fosfogluarato quinasa, promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, promotor metalotioneína, promotor alcohol deshidrogenasa-2, y promotor hexoquinasa.
- Si la construcción de expresión es para proporcionarla o introducirla en una célula vegetal, entonces se pueden utilizar promotores víricos vegetales, tales como, por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV) (incluyendo el promotor CaMV 35S potenciado (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.106.739 y An, 1997)) o un promotor CaMV 19S. Otros promotores que se pueden utilizar para las construcciones de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, el promotor prolifera, promotor Ap3, promotores de choque térmico, promotor T-ADN 1'- o 2'- de *A. tumefaciens*, promotor poligalacturonasa, chalcona sintasa A (CHS-A) de petunia, promotor PR-1 de tabaco, promotor ubiquitina, promotor actina, promotor genético alcA, promotor pin2 (Xu y col., 1993), promotor Wipl de maíz, promotor genético trpA de maíz (Patente de EE. UU. N° 5.625.136), promotor genético CDPK de maíz, y promotor RUBISCO SSU (Patente de EE. UU. N° 5.034.322). Se pueden utilizar promotores específicos de raíz, tales como cualquiera de las secuencias de promotor descritas en la Patente de EE. UU. N° 6.455.760 o Patente de EE. UU. N° 6.696.623, o en las solicitudes de patente de EE. UU. N° 20040078841; 20040067506; 20040019934; 20030177536; 20030084486; or 20040123349, en una construcción de expresión de la invención. Los promotores constitutivos (tales como CaMV, ubiquitina, actina o el promotor NOS), los promotores regulados desarrolladamente, y los promotores inducibles (tales como los promotores que se pueden inducir por calor, luz, hormonas, o productos químicos) también se contemplan para su uso en las construcciones de polinucleótidos de expresión de la invención.
- También se pueden utilizar promotores específicos de tejidos, por ejemplo los promotores específicos de frutas, tales como el promotor E8 del tomate (número de registro: AF515784; Good y col. (1994)). También se pueden utilizar promotores específicos de semillas tales como el promotor del gen de  $\beta$ -faseolina (por ejemplo, de alubia) o un gen glicina (por ejemplo, de soja), y otros.
- Para la expresión en sistemas procariontes, una construcción de expresión de la invención puede comprender promotores tales como, por ejemplo, promotor de fosfatasa alcalina, promotor triptófano (trp), promotor lambda PL, promotor  $\beta$ -lactamasa, promotor lactosa, promotor phoA, promotor T3, promotor T7, o promotor tac (de Boer y col., 1983).
- Las construcciones de expresión pueden contener opcionalmente una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de terminación de la traducción, una secuencia que codifica un péptido de señal, y/o elementos potenciadores. Las regiones de terminación de la transcripción se pueden obtener fácilmente a partir de la región 3' sin traducir de una secuencia genética vírica o eucariota. Las secuencias de terminación de la transcripción se pueden posicionar corriente abajo de una secuencia codificante para proporcionar una terminación eficaz. Una secuencia de péptido de señal es una secuencia corta de aminoácidos que se presenta típicamente en el extremo amino de una proteína que es responsable de la resituación de un polipéptido maduro unido operativamente con un



amplio intervalo de destinos celulares post-traduccionales, variando desde un compartimento de un orgánulo específico a sitios de acción de proteínas en el medio extracelular. Los productos dirigidos del gen al destino celular y/o extracelular que se pretende por medio del uso de una secuencia de péptido de señal unido operativamente se contemplan para su uso con los polipéptidos de la invención. Los potenciadores clásicos son elementos activos cis  
 5 que aumentan la transcripción genética y también se pueden incluir en la construcción de expresión. Los elementos potenciadores clásicos se conocen en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, el elemento potenciador CaMV 35S, elemento potenciador promotor temprano citomegalovirus (CMV), y el elemento potenciador SV40. Los elementos potenciadores mediados por intrón que aumentan la expresión genética también se conocen en la técnica. Estos elementos tienen que estar presentes en la región transcrita y dependen de la orientación.

10 Las secuencias de ADN que dirigen la poliadenilación del ARNm transcrito de la construcción de expresión también se pueden incluir en la construcción de expresión, e incluyen, pero no se limitan a estas, una señal de octopina sintasa o nopalina sintasa.

15 Las construcciones de expresión también pueden incluir uno o más genes marcadores dominantes, incluyendo, por ejemplo, genes que codifican la resistencia a antibióticos y/o resistencia a herbicidas para la selección de células transformadas. Los genes de resistencia a antibióticos pueden proporcionar la resistencia a uno o más de los siguientes antibióticos: higromicina, kanamicina, bleomicina, G418, estreptomycin, paromomicina, neomicina, y espectinomycin. La resistencia a la kanamicina puede proporcionarse por la neomicina fosfotransferasa (NPT II).  
 20 Los genes de resistencia a herbicidas pueden proporcionar una resistencia a la fosfotricina acetiltransferasa o glifosato. Otros marcadores utilizados para la selección de transformación celular incluyen, pero no se limitan a estos, genes que codifican la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS),  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, nopalina sintasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína de fluorescencia verde (GFP), o GFP potenciada (Yang y col., 1996).

25 La divulgación también se refiere a vectores de polinucleótidos que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido. Los sitios únicos de restricción enzimática se pueden incluir en los extremos 5' y 3' de una construcción de expresión o polinucleótido de la invención para permitir la inserción de un vector polinucleótido. Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a cualquier elemento genético, incluyendo por ejemplo, plásmidos, cósmidos, cromosomas, fagos, virus, y similares que son capaces de replicación cuando se asocian con los elementos de control adecuados y con los que se pueden transferir secuencias de polinucleótidos  
 30 entre células. Los vectores contienen una secuencia de nucleótidos que permite al vector replicarse en una célula huésped seleccionada. Varios vectores están disponibles para la expresión y/o clonación, e incluyen, pero no se limitan a estos, pBR322, serie pUC, serie M 13, serie pGEM, y vectores pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, CA y Promega, Madison, WI).

35 La divulgación también se refiere a sondas de oligonucleótidos y cebadores, tales como los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que pueden hibridarse con una secuencia codificante o no codificante de un polinucleótido de la presente invención. Las sondas de oligonucleótidos se pueden utilizar en los métodos para detectar las secuencias de ácido nucleico del virus de la influenza. Los oligonucleótidos cebadores se pueden utilizar en métodos de PCR y otros métodos que implican la amplificación de ácidos nucleicos. Una sonda o cebador se puede hibridar con un polinucleótido bajo condiciones rigurosas. Las sondas y cebadores pueden comprender  
 40 opcionalmente un marcador detectable o una molécula indicadora, tal como moléculas fluorescentes, enzimas, restos radioactivos, y similares. Las sondas y cebadores pueden ser de cualquier longitud que sea adecuada para el método o ensayo en el que se emplean. Típicamente, las sondas y cebadores serán de 10 a 500 o más nucleótidos de longitud. Se contemplan sondas y cebadores que tienen 10 a 20, 21 a 30, 31 a 40, 41 a 50, 51 a 60, 61 a 70, 71 a 80, 81 a 90, 91 a 100, o 101 o más nucleótidos de longitud. Las sondas y cebadores son 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 una identidad de secuencias de nucleótidos completa (100%) con la secuencia del polinucleótido, o la identidad de secuencias puede ser menor del 100%. Por ejemplo, la identidad de secuencia entre una sonda o un 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 y cuando la sonda o el cebador se puedan hibridar bajo  
 50 condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido. Sondas y cebadores ejemplificados incluyen los que tienen la secuencia de nucleótidos mostrados en cualquiera de la 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 la SEC ID N° 46, o un fragmento o variante funcional de cualquiera de las SEC ID N°<sup>os</sup> 35-46.

60 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un desoxirribonucleótido, ribonucleótido, o un polímero de desoxirribonucleótido y ribonucleótido mezclados sea en una forma mono o bicatenaria, y a menos que lo limite otra cosa, englobarían análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los nucleótidos que se encuentran naturalmente. Las secuencias de polinucleótidos incluyen la secuencia de una cadena de ADN que se puede transcribir en ARN y la cadena de ARN que se puede traducir en proteínas. Se contempla la secuencia complementaria de cualquier ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido. Las secuencias de polinucleótidos también incluyen tanto las secuencias de longitud completa así como secuencias más cortas derivadas de las secuencias de longitud completa.  
 65 Se contemplan los polinucleótidos que son complementarios a la secuencia de los polinucleótidos desvelados. Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención se pueden proporcionar en forma purificada o aislada.

Debido a la degeneración del código genético, una variedad de diferentes secuencias de polinucleótido pueden codificar un polipéptido. Se describe una tabla que muestra todos los tripletes de codones posibles (y donde U también está por T) y el aminoácido codificado por cada codón, en Lewin (1985). Además, está dentro de la experiencia habitual de un experto entrenado en la técnica, crear secuencias de polinucleótido alternativas que codifican los mismos, o esencialmente los mismos, polipéptidos del objetivo de la invención. Estas variantes degeneradas y las secuencias de polinucleótido alternativas están dentro del ámbito del objetivo de la invención. Como se utiliza en el presente documento, las referencias a "esencialmente la misma" secuencia se refiere a secuencias que codifican sustituciones, eliminaciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no alteran materialmente la actividad funcional y/o inmunogénica del polipéptido codificado por los polinucleótidos.

La divulgación también se refiere a variantes de los polinucleótidos que codifican polipéptidos. Secuencias variantes incluyen las secuencias en las que uno o más nucleótidos de la secuencia se han sustituido, eliminado y/o insertado. Los nucleótidos que se pueden sustituir por nucleótidos naturales de ADN tienen un resto básico que puede incluir, pero no se limitan a estos, inosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, hipoxantina, 1-metilguanina, 5-metilcitosina, y bases tritiladas. El resto de azúcar del nucleótido en una secuencia también se puede modificar e incluye, pero no se limita a estos, arabinosa, xilulosa, hexosa. Además, se pueden modificar las bases de nucleótidos adenina, citosina, guanina, timina, y uracilo con grupos acetil, metil, y/o tio.

También se contemplan la sustitución de aminoácidos distintos de los ejemplificados específicamente o los presentes naturalmente en un polipéptido. Por ejemplo, se pueden sustituir los aminoácidos de un polipéptido por aminoácidos no naturales, siempre que el polipéptido que tiene los aminoácidos sustituidos mantenga sustancialmente la misma actividad funcional que el polipéptido en el que no se han sustituido aminoácidos. Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a estos, ornitina, citrulina, hidroxiprolina, homoserina, fenilglicina, taurina, yodotirosina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 2-amonobutírico, ácido  $\gamma$ -amino butírico, ácido  $\epsilon$ -amino hexanoico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, norleucina, norvalina, sarcosina, homocitrulina, ácido cisteico,  $\tau$ -butilglicina,  $\tau$ -butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoro aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como  $\beta$ -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 derivados. Además, cualquiera de los aminoácidos de las proteínas puede estar en forma D (dextrógiros) o L (levógiros). También se contemplan las variantes alélicas de una secuencia proteica de un polipéptido.

Los aminoácidos se pueden clasificar en las siguientes clases: no polares, polares sin carga, básicos y ácidos. Se contemplan las sustituciones conservadoras por las que un polipéptido que tiene un aminoácido de una clase se reemplaza por otro aminoácido de la misma clase siempre y cuando el polipéptido que tiene la sustitución aún mantenga sustancialmente la misma actividad funcional que el polipéptido que no tiene la sustitución. Se contemplan polinucleótidos que codifican un polipéptido que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en su secuencia. La Tabla 11 posterior proporciona una lista de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase. Las abreviaturas de aminoácidos con una sola letra se definen en la Tabla 12.

Los fragmentos y variantes de polipéptidos del virus de la influenza se puede generar utilizando métodos de referencia conocidos en la técnica y la presencia de su función o inmunogenicidad se ensaya utilizando técnicas de referencia conocidas en la técnica. Por ejemplo, para ensayar fragmentos y/o variantes de un polipéptido neuraminidasa de la invención, se puede ensayar la actividad enzimática. Por lo tanto, un experto habituado puede fácilmente preparar y ensayar fragmentos y variantes de un polipéptido de la invención y determinar si el fragmento o variante mantiene la actividad con respecto al polipéptido de longitud completa o no variante.

Se pueden definir los polinucleótidos y polipéptidos en términos de identidad más particular y/o intervalos de similitud. La identidad de secuencia será típicamente mayor del 60%, preferentemente mayor del 75%, más preferentemente mayor del 80%, incluso más preferentemente 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 el presente documento. A menos de que se especifique otra cosa, como se utiliza en el presente documento el porcentaje de identidad de secuencia y/o similitud de dos secuencias se puede determinar utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), modificado como en Karlin y Altschul (1993). Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990). Las búsquedas BLAST se pueden llevar a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabras = 12, para obtener secuencias con el porcentaje de identidad de secuencia que se desea. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede utilizar el Gapped BLAST como se describe en Altschul y col. (1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (NBLAST y XBLAST). Véase la página de internet de NCBI/NIH.

También se contemplan las moléculas de polinucleótidos que tienen secuencias que son suficientemente homólogas con las secuencias de polinucleótidos ejemplificados en el presente documento de forma que permitan la hibridación con esta secuencia bajo condiciones rigurosas de referencia y métodos de referencia (Maniatis y col., 1982). Como

se utiliza en el presente documento, condiciones "rigurosas" de hibridación se refieren a condiciones en las que la hibridación se llevan a cabo durante una noche a 20-25 °C por debajo de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del híbrido ADN en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La temperatura de fusión, T<sub>m</sub>, se describe por la fórmula siguiente (Beltz y col., 1983):

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

Los lavados se llevan a cabo típicamente de la siguiente manera:

- (1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1x SSPE, 0,1% SDS (lavado de baja rigurosidad).
- (2) Una vez a T<sub>m</sub>-20 °C durante 15 minutos en 0,2x SSPE, 0,1% SDS (lavado con rigurosidad moderada).

La divulgación también se refiere a proteínas y péptidos víricos codificados por genes de un virus de la influenza. La proteína vírica puede 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 la SEC ID N° 33 o SEC ID N° 34, o un fragmento o variante funcional y/o inmunogénico de la SEC ID N° 33 o SEC ID N° 34. La proteína vírica puede ser una proteína NA, proteína NS, proteína PB, proteína PA, o proteína MA. Las proteínas víricas y péptidos se pueden utilizar para generar anticuerpos que se unan específicamente a la proteína o péptido. Las proteínas y péptidos víricos también se pueden utilizar como inmunógenos y en composiciones vacunales.

La divulgación también se refiere a composiciones y métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la influenza que es capaz de infectar un animal huésped susceptible y producir una enfermedad respiratoria. Se puede llevar a cabo la inducción de una respuesta inmunitaria contra cualquier subtipo de un virus de la influenza en un animal huésped susceptible. Por ejemplo, el virus de la influenza puede ser de un subtipo HA: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, o H16, y un subtipo NA: N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, o N9. En una realización, el subtipo HA es H3 o H5. El subtipo NA puede ser N7 o N8. Se puede inducir una respuesta inmune contra un virus de la influenza del subtipo H3N8. El animal huésped puede ser un cánido. Los caninos incluyen los caninos silvestres, de zoo, y domésticos, tales como lobos, coyotes y zorros. Los caninos también incluyen los perros, particularmente los perros domésticos, tales como por ejemplo, los perros de compañía de pura raza o mestizos, perros de concurso, perros de trabajo, perros pastores, perros de caza, perros de guarda, perros policía, perros de carreras, y/o perros de laboratorio. El animal huésped puede ser un perro domesticado, tal como un galgo Greyhound. Al animal se le puede administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la influenza. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral y/o celular. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria protectora que sea capaz de prevenir o minimizar la infección vírica en el animal huésped inmunizado por un periodo de tiempo posterior a la inmunización. La divulgación se refiere a composiciones y métodos que pueden proporcionar un animal vacunado con una respuesta inmunitaria protectora contra un virus.

Como se describe en el presente documento, la vacuna o composiciones inmunogénicas pueden comprender virus completos libres de células, incluyendo virus atenuados o inactivados, o partes del virus, incluyendo partículas de subvirión (incluyendo "vacunas de subunidades" en las que se trata el virión para retirar algunos o todos los lípidos víricos), proteínas víricas (incluyendo las proteínas individuales y los complejos macromoleculares de múltiples proteínas), polipéptidos, y péptidos, así como líneas celulares infectadas con el virus, o una combinación de cualquiera de estos. La vacuna o las composiciones inmunogénicas que comprenden líneas celulares infectadas con el virus pueden comprender múltiples líneas celulares, cada una de ellas infectada con una cepa vírica diferente.

Un canino se puede inmunizar con una o más vacunas de virus de la influenza inactivado (es decir, destruido) y/o vivo atenuado o vacunas que comprenden uno o una multiplicidad de antígenos de virus de la influenza de uno o más aislados de virus. El virus de la influenza puede ser un virus de la influenza canina. El virus de la influenza puede ser un virus de la influenza equina que codifica o expresa un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 96%, o el 97%, o el 98%, o el 99% o más con un polipéptido del virus de la influenza canina. Un antígeno de influenza que se utiliza en una vacuna puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 96% con un antígeno HA o un antígeno NA de un virus de la influenza canina.

Un ejemplo de vacuna inactivada es EQUICINE II™, que se ha comercializado por Intervet Inc. (Millsboro, DE, EE.UU.) como una vacuna líquida. EQUICINE II™ contiene virus inactivado de influenza A/Pennsylvania/63 ("A/Pa/63") y virus de influenza A/equine/Kentucky/93 ("A/KY/93") con carbopol (es decir, HAVLOGEN® (Intervet Inc.)). Más específicamente, una dosis de EQUICINE II™ contiene: 10<sup>6.0</sup> EID<sub>50</sub> de A/Pa/63 inactivado, 10<sup>6.7</sup> EID<sub>50</sub> de A/KY/93 inactivado, 0,25% de carbopol y suficiente PBS para crear un volumen total de 1 ml.

Otro ejemplo de vacuna inactivada es el virus de gripe equina A/equine/Ohio/03 ("Ohio 03"). En algunas realizaciones, tal vacuna contiene CARBIGEN™, que es un adyuvante basado en un polímero emulsionado

disponible comercialmente en MVP Laboratories, Inc. (Ralston, NE). En tales vacunas, una dosis unitaria comprende típicamente al menos aproximadamente 250 unidades de HA del virus, desde aproximadamente 250 a aproximadamente 12.500 unidades de HA del virus, o desde aproximadamente 1.000 a aproximadamente 6.200 unidades de HA del virus. La concentración recomendada de CARBIGEN™ es desde aproximadamente el 5 a aproximadamente el 30% (por masa).

Un ejemplo de vacuna viva atenuada es el virus de influenza equina vivo modificado equine/Kentucky/91 ("A/KY/91") en forma secada por frío que se puede reconstituir con agua. La reconstitución se puede llevar a cabo utilizando agua de calidad para vacunas suficiente para dar lugar a la dosificación vacunal de un volumen total de 1 ml. Los aspectos de tales vacunas se tratan, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 6.436.408; 6.398.774; y 6.177.082. Una vez reconstituida, una dosis de tal vacuna puede, por ejemplo contener A/KY/91 a  $10^{7,2}$  TCID<sub>50</sub> 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 la caseína. N-Z AMINE AS™ está comercializado por Kerry Bio-Science (Norwich, NY, EE. UU.).

En la divulgación, la vacuna puede comprender un antígeno de influenza H3 que tiene una homología de al menos el 93% con las secuencias codificantes de HA en Florida/43/2004, tal como, por ejemplo, la cepa equine/New Market/79. La homología preferida es de al menos aproximadamente el 96%, tal como por ejemplo, las cepas equine/Alaska/1/91 y equine/Santiago/85. En los ejemplos siguientes, se incorporaron en las vacunas antígenos de influenza de equine/Kentucky/ 91, equine-2/Kentucky/93, equine-1/Pennsylvania/63, y equine Ohio/03. Las vacunas pueden incluir vacunas que comprenden equine/Wisconsin/03, equine/Kentucky/ 02, equine/Kentucky/93, y equine/New Market 2/93. Se pueden utilizar virus H3N8. Se pueden utilizar otros virus H3 de la influenza.

Las vacunas vivas atenuadas se pueden preparar por medios convencionales. Tales medios incluyen generalmente, por ejemplo, la modificación de cepas patógenas por pasaje *in vitro*, adaptación al frío, modificación de la patogenicidad del organismo por modificación genética, preparación de quimeras, inserción de antígenos en vectores víricos, selección de cepas tipo silvestre no virulentas, etc.

Las cepas de virus vivo atenuado se pueden derivar por pasaje seriado del virus tipo silvestre en cultivos celulares, animales de laboratorio, animales no huéspedes, o embrión de pollo. La acumulación de mutaciones genéticas durante tales pasajes da lugar típicamente a la pérdida progresiva de virulencia del organismo hacia el huésped original.

Las cepas de virus vivo atenuado se pueden preparar por co-infección de células permisibles con un virus mutante atenuado y virus patógeno. El virus recombinante deseado que resulta tiene la seguridad del virus atenuado con genes que codifican antígenos protectores del virus patógeno.

Las cepas de virus vivo atenuado se pueden preparar por adaptación al frío. Un virus adaptado al frío tiene la ventaja de que se replica solo a la temperatura que se encuentra en el tracto respiratorio superior. Un método de generación de un virus de la influenza equina adaptada al frío se ha descrito en la Patente de EE. UU. N<sup>o</sup> 6.177.082. Un virus adaptado al frío deseado obtenido confiere uno o más de los siguientes fenotipos: adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y/o atenuación.

Las cepas de virus vivo atenuado se pueden preparar por medios moleculares, tales como mutación de punto, eliminación, o inserción, para convertir un virus patógeno en un virus no patógeno o menos patógeno en comparación con el virus original, mientras que se conservan las propiedades protectoras del virus original.

Los virus vivos atenuados se pueden preparar clonando los candidatos a ser genes de antígenos protectores, en un genoma de un virus no patógeno o menos patógeno u otro organismo.

Las vacunas de virus inactivados (es decir, destruidos) se pueden preparar inactivando el virus utilizando métodos convencionales. Típicamente, tales vacunas incluyen excipientes que pueden potenciar una respuesta inmunitaria, así como otros excipientes que se utilizan convencionalmente en las vacunas. por ejemplo, en los ejemplos siguientes, EQUICINE II™ comprende HALOGEN®. La inactivación del virus se puede conseguir tratando el virus con productos 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 alterar la capacidad de replicación del virus.

Se puede utilizar el virus Equine/Ohio/03 como virus de desafío. Se sabe que tiene una homología de aproximadamente el 99% con los aislados de Florida/43/04, y se ha demostrado que induce síntomas de infección y seroconversión en perros. El ejemplo 18 ilustra la eficacia de la vacuna de influenza equina en perros, mostrando los títulos de inhibición de la hemaglutinación (o "HI" o "HAI") en perros vacunados con el antígeno inactivado Ohio 03 en una composición vacunal que comprende el adyuvante CARBIGEN™. La Tabla 29 muestra títulos pre-vacunación, post-vacunación, y post-segunda vacunación, así como post-desafío. Los resultados indican los títulos HI en cada estado de post-vacunación en los perros vacunados, con poco o ningún aumento en los controles. La Tabla 30 ilustra los signos clínicos, aislamiento del virus, y resultados histopatológicos del mismo estudio. Aunque

los animales desafiados no mostraban signos clínicos, supresión vírica, o histopatología positiva, los títulos de HI positivos (Tabla 29) indican títulos de anticuerpos significativos en los animales inmunizados.

5 Se desvelan otras vacunas de antígenos H3 del virus de la influenza. Los siguientes ejemplos con respecto a lo que se relacionan con la materia objetivo de las reivindicaciones se proporcionan para ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas.

10 Se pueden utilizar antígenos de influenza distintos de los antígenos H3 del virus de la influenza. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, los de equine/PA/63, que es un subtipo A 1 equino (H7N7). Se contempla que se pueden utilizar uno o más de tales antígenos con o sin uno o más antígenos H3 de influenza.

15 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, retrasa la aparición de, reduce la diseminación de, mejora, suprime, o erradica la influenza o uno o más (típicamente dos o más) de sus síntomas. Los síntomas de influenza típicos incluyen, por ejemplo, fiebre (para los perros, típicamente  $\geq 103,0$  °F;  $\geq 39,4$  °C), tos, estornudos, lesiones histopatológicas, descarga ocular, descarga nasal, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, arcadas, hemoptisis, y/o ritmos audibles. Otros síntomas a menudo 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 el lumen de vías aéreas del pulmón con neutrófilos y/o macrófagos.

25 La vacuna se puede administrar como parte de una terapia de combinación, es decir, una terapia que incluye, además de la vacuna en sí misma, la administración de uno o más agentes activos adicionales, adyuvantes, terapias, etc. En este caso, se debería reconocer 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 se administrara sola. Otras terapias pueden incluir las conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, medicaciones antivíricas, analgésicos, medicaciones reductoras de la fiebre, expectorantes, medicaciones antiinflamatorias, antihistamínicos, antibióticos para tratar la infección bacteriana que se produce con la infección por el virus de la influenza, reposo, y/o administración de fluidos. La vacuna se puede administrar en combinación con una vacuna de *Bordetella*, vacuna de adenovirus, y/o vacunas del virus de la parainfluenza.

35 Una dosis típica para una vacuna viva atenuada puede ser de al menos aproximadamente  $10^3$  ufp/canino, y más típicamente de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$  ufp/canino. En la presente patente, “ufp” significa “unidades formadoras de placas”. Una dosis típica para una vacuna viva atenuada puede ser al menos aproximadamente  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/canino, y más típicamente desde aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/canino. Una dosis típica para una vacuna viva atenuada puede ser al menos aproximadamente  $10^3$  EID<sub>50</sub>/canino, y más típicamente desde aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$  EID<sub>50</sub>/canino. Una típica dosis para una vacuna inactivada puede ser al menos aproximadamente de 40 unidades HA, típicamente desde aproximadamente 40 a aproximadamente 10.000 unidades HA, y más típicamente desde aproximadamente 500 a aproximadamente 6.200 unidades HA. La dosis puede ser desde aproximadamente 6.100 a aproximadamente 6.200 unidades HA.

45 La vacuna puede comprender una vacuna viva atenuada a una concentración que sea al menos aproximadamente  $10^{0,5}$  ufp/canino mayor que el nivel de inmunogenicidad. La vacuna puede comprender una vacuna viva atenuada a una concentración que sea al menos aproximadamente  $10^{0,5}$  TCID<sub>50</sub>/canino mayor que el nivel de inmunogenicidad. La vacuna puede comprender una vacuna atenuada viva a una concentración que sea al menos aproximadamente  $10^{0,5}$  EID<sub>50</sub>/canino mayor que el nivel de inmunogenicidad.

50 El nivel de inmunogenicidad se puede determinar experimentalmente por técnicas de titulación de dosis de desafío que se conocen generalmente en la técnica. Tales técnicas típicamente incluyen la vacunación de varios caninos con la vacuna a diferentes dosificaciones, y luego se desafía a los caninos con el virus virulento para determinar la dosis mínima protectora.

55 Los factores que afectan al régimen de dosificación preferida pueden incluir, por ejemplo, el tipo (por ejemplo, especie y raza), la edad, peso, sexo, dieta, actividad, tamaño de los pulmones, y estado físico del sujeto; la vía de administración, la eficacia, seguridad y duración de los perfiles de inmunidad de la vacuna particular utilizada; si se utiliza un sistema de suministro; y si la vacuna se administra como parte de un fármaco y/o combinación de vacunas. Por lo tanto, la dosis que se emplea actualmente puede variar para animales específicos, y, por lo tanto, se pueden desviar de las dosificaciones típicas que se han expuesto anteriormente. La determinación de tales ajustes en la dosificación generalmente está dentro de la experiencia en la técnica utilizando medios convencionales. Se debería señalar además que los virus vivos atenuados generalmente se autopropagan; por lo tanto, la cantidad específica que se administra de tales virus no es necesariamente crítica.

65 Una vacuna se puede administrar a un paciente canino en una sola vez; o, alternativamente, en dos o más veces durante días, semanas, meses o años. La vacuna se puede administrar al menos en dos veces. La vacuna se puede

5 administrar dos veces, con la segunda dosis (por ejemplo, el refuerzo) administrada al menos aproximadamente 3 semanas después de la primera. La vacuna se puede administrar dos veces, con la segunda dosis administrada no más de 8 semanas después de la primera. La segunda dosis se puede administrar desde aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 años después de la primera dosis, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 semanas después de la primera dosis, o desde aproximadamente 3 a aproximadamente 4 semanas después de la primera dosis. La segunda dosis se puede administrar aproximadamente 4 semanas después de la primera dosis. La primera y posteriores dosificaciones pueden variar, tal como, por ejemplo, en cantidad y/o forma. A menudo, sin embargo, las dosificaciones son las mismas en cantidad y forma. Cuando solo se administra una dosis, la cantidad de vacuna es la dosis única que comprende generalmente una cantidad eficaz de vacuna. Sin embargo, cuando se administra más de una dosis, las cantidades de vacuna en estas dosis juntas pueden constituir una cantidad terapéuticamente eficaz.

15 La vacuna se puede administrar antes de que el receptor canino se infecte con influenza. La vacuna puede, por ejemplo, administrarse para prevenir, reducir el riesgo de, o retrasar la aparición de influenza o uno o más (típicamente dos o más) síntomas de influenza.

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

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

25 La expresión "aceptable farmacéuticamente" se utiliza como un adjetivo para decir que el nombre modificado es apropiado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se utiliza, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza al excipiente que es compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudica con desventaja al presunto receptor canino.

35 Las vacunas se pueden administrar por medios convencionales, incluyendo, por ejemplo, la administración mucosa, (tal como la intranasal, oral, intratraqueal, y ocular), y la administración parenteral. La administración mucosa a menudo es particularmente ventajosa para las vacunas vivas atenuadas. La administración parenteral es a menudo particularmente ventajosa para vacunas inactivadas.

40 Las vacunas mucosas pueden ser, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, tales como emulsiones farmacéuticamente aceptables, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Los excipientes adecuados para tales vacunas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes utilizados habitualmente en la técnica, tales como, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de ácidos alcanoicos de celulosa, alquil ésteres de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato magnésico, óxido magnésico, sales de sodio y calcio de ácidos sulfúrico y fosfórico, gelatina, goma arábiga, alginato sódico, polivinilpirrolidona, y/o alcohol polivinílico. Los excipientes también comprenden varios agentes humectantes, emulsionantes, suspensores, saborizantes (por ejemplo, edulcorantes), y/o agentes aromatizantes.

45 Las vacunas para mucosa oral 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 contener agentes tamponantes, tales como citrato sódico, o carbonato o bicarbonato magnésico o cálcico. Los comprimidos y píldoras se pueden preparar adicionalmente con revestimientos entéricos.

las vacunas se pueden administrar por medio del agua de bebida y/o la comida del paciente canino. La vacuna se puede administrar en forma de golosina o juguete.

55 La "administración parenteral" incluye las inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraesternales, inyecciones transcutáneas, e infusión. Las preparaciones inyectables (por ejemplo, suspensiones estériles acuosas u oleosas) se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando excipientes adecuados, tales como vehículos, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y/o agentes suspensores. Estos incluyen típicamente, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de maní, aceite de sésamo, alcohol bencílico, 1,3-butanodiol, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico, mezclas de aceites no volátiles (por ejemplo mono- o diglicéridos), ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), dimetil acetamida, tensioactivos (por ejemplo, detergentes iónicos o no iónicos), propilenglicol, y/o polietilen glicoles. Los excipientes también incluyen pequeñas cantidades de otras sustancias auxiliares, tales como agentes tamponantes.

65

las vacunas pueden incluir uno o más excipientes que aumentan la respuesta inmunitaria del paciente (que pueden incluir una respuesta de anticuerpos, una respuesta celular, o ambas), de esta manera se aumenta la efectividad de la vacuna. El uso de tales excipientes (o adyuvantes) puede ser particularmente beneficiosos cuando se utiliza una vacuna inactivada. El adyuvante(s) puede ser una sustancia que tiene un efecto directo (por ejemplo, citoquina de Bacillé Calmette-Guerin ("BCG")) o indirecto (liposomas) sobre las células del sistema inmunitario del paciente canino. Ejemplo de los adyuvantes adecuados a menudo incluyen aceites (por ejemplo, aceites minerales), sales minerales (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 más sustancias que tienen un efecto de vehículo (por ejemplo, bentonita, partículas de látex, liposomas, y/o Quil A, ISCOM). Como se señaló anteriormente, los adyuvantes también incluyen, por ejemplo, CARBIGEN™ y carbopol. Debería reconocerse que la presente invención engloba ambas vacunas, las que comprenden un adyuvante(s), así como las vacunas que no comprenden ningún adyuvante.

Se contempla que las vacunas pueden estar secadas por frío (o con el volumen de líquido reducido de otra manera) para almacenarlas, y luego se reconstituyen en un líquido antes o en el momento de la administración. Tal reconstitución se puede conseguir utilizando, por ejemplo, agua de calidad vacunal.

Además se desvelan 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. El kit también comprende al menos un componente adicional, y, típicamente, instrucciones de uso de la vacuna con el componente(s) adicional (tal como, por ejemplo, uno o más de los excipientes tratados anteriormente, comida, y/o una golosina) que se puede mezclar con la vacuna antes o durante la administración. El componente(s) adicional puede comprender de manera alternativa (o adicionalmente) uno o más aparatos para administrar la vacuna al paciente canino. Tal aparato puede ser por ejemplo, una jeringa, un inhalador, nebulizador, pipeta, fórceps, o cualquier otro dispositivo de vehículo médicamente aceptable. El aparato puede ser adecuado para la administración subcutánea de la vacuna. El aparato puede ser adecuado para la administración intranasal de la vacuna.

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

La vacuna de composiciones inmunogénicas también engloba construcciones recombinantes basadas en un vector vírico, por ejemplo genes que codifican la proteína HA, proteína NA, nucleoproteína, proteína básica polimerasa, proteína ácida polimerasa, y/o proteína de la matriz de un virus de influenza de la presente invención. Se contempla cualquier vector vírico adecuado que se pueda utilizar para preparar una construcción recombinante en un vector vírico. Por ejemplo, se pueden utilizar en las composiciones y métodos vectores víricos derivados de adenovirus, viruela aviar, herpesvirus, vacunales, viruela del canario, viruela de insectos, viruela porcina, virus del Nilo occidental y otros conocidos en la técnica. Los vectores de polinucleótidos recombinantes que codifican y expresan componentes se pueden construir utilizando técnicas de modificación genética de referencia que se conocen en la técnica. Además, las distintas composiciones vacunales descritas en el presente documento se pueden utilizar separadamente y en combinación unas con otras. Por ejemplo, las inmunizaciones primarias de un animal pueden utilizar construcciones recombinantes basadas en un vector, que tengan componentes de cadena simple o múltiple, seguidas por refuerzos secundarios con composiciones vacunales que comprenden virus inactivados o líneas celulares infectadas con virus inactivadas. Otros protocolos de inmunización con las composiciones vacunales son aparentes para los expertos en la técnica.

La divulgación también se refiere a virus combinados que comprenden al menos un gen o segmento genómico de un virus de la influenza y el resto de los genes o segmentos genómicos de un virus de influenza diferente. Los virus combinados se pueden producir por combinación genética de ácido nucleico de un virus de influenza donante de la presente invención con el ácido nucleico de un virus de influenza receptor, y luego seleccionando el virus combinado que comprende el ácido nucleico del virus donante. Los métodos para producir y aislar virus combinados se conocen bien en la técnica (Fields y col., 1996). Un virus combinado puede comprender genes o segmentos genómicos de un virus de influenza de un ser humano, un ave, un cerdo o un equino. Un virus combinado puede incluir cualquier combinación de ácido nucleico del virus de influenza donante y receptor. Un virus de influenza receptor puede ser un virus de la influenza equina.

También se pueden utilizar como composiciones vacunales, polipéptidos naturales, recombinantes o sintéticos de proteínas víricas, y fragmentos de péptidos de los mismos. Una composición vacunal puede comprender un polinucleótido o un polipéptido de un virus de la influenza canina. Una composición vacunal puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 o variante funcional y/o inmunogénico de la misma. El polinucleótido codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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, comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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 y/o inmunogénico de cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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: los Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N° 3; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N° 5; Nucleótidos 1-657 de la SEC ID N° 7; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N° 9; Nucleótidos 1-1410 de la SEC ID N° 11; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N° 13; Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N° 15; Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N° 19; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N° 21; Nucleótidos 1-657 de la SEC ID N° 23; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N° 25; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N° 29; Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N° 31; Nucleótidos 1-2277 de la SEC ID N° 47; Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N° 49; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N° 51; Nucleótidos 1-690 de la SEC ID N° 53; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N° 55; Nucleótidos 1-1410 de la SEC ID N° 57; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N° 59; Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N° 61; Nucleótidos 1-2277 de la SEC ID N° 63; Nucleótidos 1-2271 de la SEC ID N° 65; Nucleótidos 1-2148 de la SEC ID N° 67; Nucleótidos 1-690 de la SEC ID N° 69; Nucleótidos 1-1494 de la SEC ID N° 71; Nucleótidos 1-1410 de la SEC ID N° 73; Nucleótidos 1-756 de la SEC ID N° 75; y Nucleótidos 1-1695 de la SEC ID N° 77. Una composición vacunal puede comprender un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de 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, o un fragmento o variante funcional y/o inmunogénico de la misma. Una composición vacunal puede comprender un polinucleótido o un polipéptido de la influenza equina en la que el polinucleótido o polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 96%, o el 97%, o el 98%, o el 99% o más con un polinucleótido o polipéptido de la influenza canina. Los polipéptidos víricos se pueden derivar de múltiples cepas y se combinan en una composición vacunal y se usan para vacunar un animal huésped. Por ejemplo, se pueden combinar polipéptidos basados en la proteína HA vírica de al menos dos cepas diferentes de virus de influenza en una vacuna. Los polipéptidos pueden ser homólogos con una cepa o puede comprender polipéptidos híbridos o quiméricos cuya secuencia de aminoácidos se deriva de la unión o ligado de polipéptidos de al menos dos cepas distintas. Los procedimientos para preparar polipéptidos víricos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se pueden sintetizar los polipéptidos y péptidos víricos utilizando métodos de síntesis en fase sólida (Merrifield, 1963). Los polipéptidos y péptidos se pueden producir también utilizando técnicas de ADN recombinante en el que una molécula de polinucleótido que codifica una proteína o un péptido vírico se expresa en una célula huésped, tal como una bacteria, levadura, o líneas celulares de mamíferos, y la proteína expresada se purifica utilizando técnicas de referencia en la técnica.

30 Las composiciones vacunales incluyen composiciones de ácido nucleico desnudo, Un ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA y/o una proteína NA de un virus de influenza. Los métodos para la vacunación con ácido nucleico se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N°s 6.063.385 y 6.472.375. El ácido nucleico puede estar en forma de plásmidos o casete de expresión genética. El ácido nucleico puede proporcionarse encapsulado en un liposoma que se administra a una animal.

Las composiciones vacunales e inmunógenos, tales como polipéptidos y ácidos nucleicos, se pueden proporcionar en un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos y composiciones se pueden formular de acuerdo con los métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones se describen en detalle en varias fuentes que son bien conocidas y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science by E.W. Martin, Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19<sup>a</sup> ed., 1995, se describen formulaciones que se pueden utilizar. En general, las composiciones se formularían de tal manera que se combine una cantidad eficaz de un inmunógeno con un vehículo adecuado con el fin de facilitar la administración eficaz de la composición. Las composiciones utilizadas pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólida, semisólida y líquida, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones líquidas, o suspensiones, supositorios, soluciones inyectables y para infusión, y aerosoles. La forma preferida depende del modo de administración que se pretende y la aplicación terapéutica. Las composiciones también incluyen preferentemente vehículos y diluyentes convencionales farmacéuticamente aceptables que se conocen por los expertos en la técnica. Ejemplos de vehículos o diluyentes para su uso con los peptidomiméticos objetivo incluyen, pero no se limitan a estos, agua, solución salina, aceites, incluyendo aceite mineral, etanol, dimetil sulfoxido, gelatina, ciclodextranos, estearato magnésico, dextrosa, celulosa, azúcares, carbonato cálcico, glicerol, aluminio, almidón, y vehículos y diluyentes equivalentes, o mezclas de cualquiera de estos. Las formulaciones de un inmunógeno también pueden comprender agentes de suspensión, protectores, lubricantes, tampones, conservantes, y estabilizantes, para proporcionar la administración de tales dosificaciones para el tratamiento terapéutico deseado, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán ventajosamente entre aproximadamente un 0,1% y un 45%, y especialmente 1 y 15% por peso del inmunógeno o inmunógenos basándose en el peso de la composición total incluyendo el vehículo o diluyente.

La vacuna y las composiciones inmunogénicas se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la vacuna o inmunógenos se preparan típicamente como inyectables, por ejemplo, soluciones líquidas o suspensiones. Las vacunas o inmunógenos se administran de una manera que es compatible con la dosificación de la formulación, y en tal cantidad que será terapéuticamente eficaz e inmunogénica en el receptor. Las dosificaciones óptimas y los patrones de administración para una vacuna en particular o formulación de inmunógenos se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica.

65



Los péptidos y/o polipéptidos pueden proporcionarse también en forma de una construcción de péptido antigénico múltiple (MAP). La preparación de construcciones MAP se ha descrito en Tan (1988). Las construcciones MAP utilizan una matriz central de restos de lisina en los que se sintetizan múltiples copias de un inmunógeno (Pont y col., 1988). Se pueden preparar y administrar construcciones MAP múltiples, que contienen cada una el mismo o diferentes inmunógenos, en una composición vacunal. Una construcción MAP se puede proporcionar y/o administrar con uno o más adyuvantes. Los polipéptidos de influenza también se pueden producir y administrar como estructuras proteicas macromoleculares que comprenden uno o más polipéptidos. La solicitud publicada de Patente de EE. UU. US2005/009008 describe métodos para producir partículas similares a virus como una vacuna para el virus de la influenza.

Las composiciones vacunales e inmunogénicas que se describen en el presente documento se pueden administrar a huéspedes susceptibles, típicamente los cánidos, y más típicamente los perros domesticados, en una cantidad eficaz y una manera para inducir una inmunidad protectora contra un desafío posterior o infección del huésped por el virus. El animal huésped puede ser un cánido. Los cánidos incluyen caninos salvajes, del zoo, domésticos, tales como lobos, coyotes y zorros. Los caninos también incluyen perros, particularmente perros domésticos tales como, por ejemplo, perros de pura raza y/o mestizos de compañía, perros de exhibición, perros de trabajo, perros pastores, perros de caza, perros de guarda, perros policía, perros de carreras, y/o perros de laboratorio. El animal huésped puede ser un perro domesticado, tal como un galgo Greyhound. Las vacunas o inmunógenos se pueden administrar por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, sea por vía subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular. Otros modos adecuados de administración incluyen la administración oral o nasal. Normalmente, 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 inicial y de refuerzo de la vacuna o inmunógenos, y puede depender de juicio del médico veterinario y en particular del animal huésped que se va a tratar.

Los virus y células infectadas con virus en una formulación vacunal pueden estar inactivados o atenuados utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los virus completos y las células infectadas se pueden inactivar o atenuar por exposición a paraformaldehído, formalina, beta-propiolactona (BPL), bromoetilamina (BEA), etilenimina binaria (BEI), fenol, rayos UV, temperatura elevada, congelación/descongelación, sonicación (incluyendo ultrasonicación), y similares. La cantidad de virus completo libre de células en una dosis vacunal puede estar en el intervalo desde aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 4 mg, y más habitualmente está desde aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 2 mg. La dosificación de las formulaciones vacunales que comprenden líneas celulares infectadas con virus contendrán normalmente desde aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^8$  células por dosis, y más habitualmente desde aproximadamente  $5 \times 10^6$  a aproximadamente  $7,5 \times 10^7$  células por dosis. La cantidad de proteína o péptido inmunógeno en una dosis para un animal puede variar desde aproximadamente 0,1  $\mu$ g a 10.000  $\mu$ g, o aproximadamente 1  $\mu$ g a 5.000  $\mu$ g, o aproximadamente 10  $\mu$ g a 1.000  $\mu$ g, o aproximadamente de 25  $\mu$ g a 750  $\mu$ g, o aproximadamente 50  $\mu$ g a 500  $\mu$ g, o 100  $\mu$ g a 250  $\mu$ g, dependiendo del tamaño, edad, etc., del animal que recibe la dosis.

Una composición vacunal o inmunogénica, tal como virus o células infectadas con un virus o proteínas o péptidos víricos, se puede combinar con un adyuvante, típicamente justo antes de la administración. Los adyuvantes contemplados para su uso en las formulaciones vacunales incluyen treonín muramil dipéptido (MDP) (Byars y col., 1987), saponina, *Corynebacterium parvum*, adyuvantes completo e incompleto de Freund, aluminio o una mezcla de cualquiera de estos. Se conocen bien en la técnica una variedad de otros adyuvantes, tales como el alumbre.

La divulgación también se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a una proteína o un péptido. Los anticuerpos incluyen composiciones de anticuerpos policlonales o monoclonales. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Se contemplan los anticuerpos completos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Por tanto, por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno adecuados incluyen fragmentos de anticuerpos Fab2, Fab y Fv. Los anticuerpos se pueden marcar con un resto detectable, tal como una molécula fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o una enzima).

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

La capacidad para detectar la influenza canina en un animal permite evaluar los brotes de influenza canina en diferentes localizaciones geográficas. Esta información también permite la detección precoz para que los animales infectados se puedan aislar, para limitar la diseminación de la enfermedad, y permite la intervención precoz de las opciones de tratamiento. Además, teniendo esta información disponible se puede proporcionar una dirección al

personal médico para prepararse para tratar grandes números de animales enfermos, incluyendo el acopio de suministros médicos y, si están disponibles, vacunas.

5 Un método de la presente divulgación implica la recolección de una muestra biológica de un animal de ensayo, tales como un canino. La muestra biológica puede ser cualquier material biológico, incluyendo, células, tejidos, pelo, sangre completa, suero, plasma, aspirados del pezón, lavado pulmonar, líquido cefalorraquídeo, saliva, sudor y lágrimas.

10 La muestra del animal de ensayo puede venir de un animal sospechoso de tener un virus de influenza canina, tanto si el animal muestra síntomas de la enfermedad o no. También se pueden proporcionar muestras de control o recolectadas de animales que se sabe que están libres de influenza canina. Se pueden proporcionar controles adicionales, por ejemplo, para reducir los resultados falsos positivos y falsos negativos, y verificar si los reactivos del ensayo están detectando activamente el virus A de influenza canina.

15 Además para detectar la presencia o ausencia de influenza canina en una muestra biológica, los métodos de detección pueden detectar mutaciones del virus de la influenza canina, tales como cambios en la secuencia de ácidos nucleicos, que pueden resultar del entorno, el tratamiento con fármacos, las modificaciones genéticas o mutaciones, lesiones, cambios en la dieta, envejecimiento, o cualquier otra característica(s) de un animal. Las mutaciones también pueden causar que la influenza canina A se haga resistente a un fármaco que era eficaz  
20 anteriormente, o capacitar al virus para infectar y propagarse en una especie de animal distinta, o un ser humano. por ejemplo, se ha demostrado que el virus de influenza aviar A infecta otros animales y seres humanos.

25 En uno de los medios desvelados para detectar un virus de influenza en un animal, se facilita el diagnóstico por la recolección de especímenes de alta calidad, su rápido transporte a una instalación para el ensayo, y el almacenamiento adecuado, antes del ensayo de laboratorio. El virus se detecta mejor en especímenes que contienen células infectadas y secreciones. Los especímenes para la detección directa de antígenos víricos y/o ácidos nucleicos y/o aislamiento del virus en cultivos celulares se toman durante los 3 primeros días después de la aparición de los síntomas clínicos. Varios tipos de especímenes son adecuados para diagnosticar las infecciones víricas del tracto respiratorio superior, incluyendo, pero sin limitarse a estos, torunda nasofaríngea, aspirado  
30 nasofaríngeo, lavado nasal y torunda de la garganta. Además de las torundas, se pueden tomar muestras de tejido o suero, y se pueden llevar a cabo también procedimientos invasivos.

35 Los especímenes respiratorios se pueden recolectar y transportar en 1-5 ml de medio de transporte de virus. Son satisfactorios varios medios para recuperar una amplia variedad de virus que están disponibles comercialmente. Los especímenes clínicos se añaden al medio de transporte. Las torundas nasales o nasofaríngeas se pueden transportar también 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 V de albúmina bovina, añadidos en agua destilada estéril hasta 400 ml. Se pueden también 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 se esteriliza preferentemente por filtración. Los lavados nasales, tal como con  
40 solución salina estéril (0,85% NaCl), también se pueden utilizar para recolectar especímenes de los virus respiratorios.

45 El suero se puede recolectar de una cantidad de 1-5 ml de sangre completa de un animal en la fase aguda, lo antes posible tras la aparición de los síntomas clínicos, y preferentemente no más tarde de 7 días. También puede recolectarse un espécimen de suero en la fase convaleciente, por ejemplo aproximadamente a los 14 días después de la aparición de los síntomas. Los especímenes de suero pueden ser útiles para detectar anticuerpos contra los virus respiratorios en un ensayo de neutralización.

50 Las muestras se pueden recolectar de animales individuales durante un periodo de tiempo (por ejemplo, una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes, bianualmente o anualmente). La obtención de numerosas muestras de un animal individual, durante un periodo de tiempo, se puede utilizar para verificar los resultados de las detecciones anteriores, y/o para identificar la respuesta o resistencia a un tratamiento específico, por ejemplo, un fármaco terapéutico determinado.

55 Los métodos desvelados se pueden utilizar 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. Se puede utilizar cualquier método para detectar un agente patógeno, incluyendo, pero sin limitarse a estos, ensayos de anticuerpos incluyendo ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), hemaglutinación y ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI), y transferencia de Western. También se pueden utilizar métodos  
60 de cultivo celular. Los cultivos positivos pueden identificarse además utilizando inmunofluorescencia de los cultivos celulares o ensayo HI del medio de cultivo celular (sobrenadante).

65 Además, se pueden utilizar métodos para detectar ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a estos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y ensayos (RT) PCR de transcriptasa inversa y ensayos en tiempo real, y ensayos de nucleasa cuantitativa. Hay kits de ensayo disponibles

comercialmente para llevar a cabo estos ensayos. Por ejemplo, QIAGEN (Valencia, CA) vende un kit RT-PCR en una etapa, y un kit de extracción de ARN vírico.

5 El método puede utilizar un anticuerpo específico para un virus o proteína vírica. Se puede utilizar un anticuerpo específico para la proteína HA. Se puede utilizar un anticuerpo específico para una proteína NP. Una muestra adecuada, tal como de la región nasal o nasofaríngea, se obtiene de un animal y el virus o la proteína vírica se aísla de la misma. Los componentes víricos se seleccionan entonces por unión de un anticuerpo específico con una proteína tal como HA o NP, de un virus de la invención. Una muestra de suero (u otro anticuerpo que contiene la muestra) se puede obtener de un animal y el suero se selecciona por la presencia de anticuerpo que se une a una proteína de un virus. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo ELISA donde las paredes de la placa tienen proteína HA y/o NP, o un fragmento de péptido de las mismas unidas a la pared. La pared de la placa se pone en contacto entonces con suero o el anticuerpo del animal de ensayo. La presencia de anticuerpo en el animal que se une específicamente a la proteína HA y/o NP es indicativa que el animal de ensayo está infectado o había estado infectado con un virus de influenza.

15 La presencia de un agente patológico se puede detectar determinando la presencia o ausencia de anticuerpos contra el agente, en una muestra biológica. Puede pasar algún tiempo (por ejemplo, meses) después de que un animal se haya infectado antes de que se puedan detectar anticuerpos en un ensayo sanguíneo. Una vez formados, los anticuerpos normalmente persisten durante muchos años, incluso después de un tratamiento satisfactorio de la enfermedad. Encontrar anticuerpos contra la influenza canina A puede no indicar si la infección era reciente, o de algún momento en el pasado.

25 El ensayo de anticuerpos también se puede hacer en fluido(s). Los ensayos de anticuerpo incluyen ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de anticuerpo fluorescente indirectos (IFA), y transferencia de Western. Preferentemente, el ensayo de anticuerpo se hace utilizando ensayos múltiples, por ejemplo ELISA o IFA seguidos por transferencia de Western. Los ensayos de anticuerpos se pueden hacer en un proceso de dos etapas, utilizando o bien un ELISA o un ensayo IFA, seguido por transferencia de Western. El ELISA se considera un ensayo más fiable y preciso que IFA, pero IFA se puede utilizar si no está disponible el ELISA. La transferencia de Western (que es un ensayo más específico) también se puede hacer en todos los animales, particularmente los que han dado positivos o los positivos dudosos (equivocos) en un ensayo ELISA o IFA.

35 Otros ensayos basados en anticuerpos que se pueden utilizar para la detección del virus de la influenza incluyen ensayos de inhibición de la hemaglutinación. La actividad de hemaglutinación se puede detectar en una muestra biológica de un animal, utilizando glóbulos rojos de pollo o pavo como describen Burleson y col., (1992) y Kendal y col., (1982). Un virus de influenza o una proteína HA o péptido, se puede poner en contacto con una muestra de ensayo que contiene suero o anticuerpo. Luego, se añaden glóbulos rojos (RBC) de un animal, tal como un ave. Si está presente el anticuerpo anti HA, el RBC no se aglutinará. Si no está presente el anticuerpo contra HA, el RBC se aglutinará en presencia de HA. Se conocen variaciones y modificaciones de los ensayos de inhibición de la hemaglutinación en la técnica.

40 La infección de un animal también se puede determinar por aislamiento del virus a partir de una muestra, tal como una torunda nasal o nasofaríngea. El aislamiento vírico se puede llevar a cabo utilizando métodos de referencia, que incluyen el cultivo celular y la inoculación en embrión de pollo.

45 Se puede utilizar un ensayo basado en ácido nucleico para la detección de un virus. Se puede obtener una muestra de ácido nucleico de un animal y el ácido nucleico se somete a una PCR utilizando los cebadores que generarán un producto de amplificación si el ácido nucleico contiene una secuencia específica de un virus de influenza de la presente invención. Se puede utilizar una RT-PCR en un ensayo para el virus objetivo. Se puede utilizar una RT-PCR en tiempo real para ensayar un virus de influenza. Los métodos PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real se conocen en la técnica y se han descrito en las Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; 4.965.188; 5.994.056; 6.814.934; y en Saiki y col. (1985); Sambrook y col. (1989); Lee y col. (1993); y Livak y col. (1995). El ensayo PCR puede utilizar oligonucleótidos específicos para un gen de matriz (MA) y/o un gen HA de influenza. El producto de amplificación también se puede secuenciar para determinar si el producto tiene una secuencia del virus de influenza de interés. Se pueden utilizar otros ensayos basados en ácidos nucleicos para detectar y diagnosticar la infección vírica por un virus. Se puede someter una muestra que contiene un ácido nucleico a una amplificación basada en PCR utilizando cebadores directos e inversos donde los cebadores son específicos para un polinucleótido o una secuencia genética víricos. Si el ácido nucleico en la muestra es ARN, entonces se puede llevar a cabo una RT-PCR. Para la PCR en tiempo real se utiliza una sonda detectable con los cebadores.

60 Se conocen grupos de cebadores específicos para el gen de hemaglutinina (HA) para muchos virus de influenza circulantes y están desarrollándose continuamente. El genoma del virus de influenza es un ARN monocatenario, y se debe hacer una copia de ADN (ADNc) utilizando una transcriptasa inversa (RT) polimerasa. La amplificación del genoma ARN, utilizando por ejemplo RT-PCR, necesita un par de oligonucleótidos cebadores, típicamente designados basándose en la secuencia de HA conocida de subtipos A de influenza y de neuraminidasa (NM)-1. Los cebadores se pueden seleccionar tal que amplificarán específicamente el ARN de un subtipo de virus solamente. Los ADN generados utilizando los cebadores específicos de subtipo se pueden analizar posteriormente por técnicas

genéticas moleculares tales como secuenciación. El ensayo se ejecuta preferentemente con un control positivo o se confirman los productos secuenciando y comparándolos con secuencias conocidas. La ausencia de los productos PCR diana (es decir, un resultado “negativo”) puede que no descarte la presencia del virus. Los resultados tienen que estar disponibles en pocas horas sea desde torundas clínicas o cultivos celulares infectados. Los ensayos PCR y RT-PCR para el virus de influenza A han sido descritos por Fouchier y col., 2000 y Maertzdorf y col., 2004.

La divulgación también se refiere a métodos para seleccionar compuestos o fármacos que tienen actividad antivírica contra un virus. Las células infectadas con un virus se puede poner en contacto con un compuesto de ensayo o fármaco. Se determina entonces la cantidad de virus o la actividad vírica después del contacto. Estos compuestos o fármacos que muestran actividad antivírica se pueden seleccionar para posteriores evaluaciones.

La divulgación también se refiere a células aisladas infectadas con el virus de influenza. La célula puede ser una célula canina, tal como células epiteliales renales.

La divulgación también se refiere a células transformadas con un polinucleótido. Preferentemente, la secuencia de polinucleótidos se proporciona en una construcción de expresión. Más preferentemente, la construcción de expresión proporciona la sobre-expresión en la célula de un polinucleótido unido operativamente. La célula se puede transformar con una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 o variante funcional de la misma. La célula se puede transformar con un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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 que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en las SEC ID N<sup>os</sup> 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 SEC ID N<sup>os</sup> 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. La divulgación se refiere a células transformadas con una secuencia de polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 las SEC ID N<sup>os</sup> 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.

La célula transformada puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una célula vegetal, incluyendo protoplastos, o la células transformada puede ser una células 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 aviarias, y células de insectos. Las células vegetales incluyen, pero no se limitan a estas, células de dicotiledóneas, monocotiledóneas, y células de coníferas.

La divulgación se refiere a plantas, incluyendo plantas transgénicas que expresan y producen proteína vírica o polipéptidos. Se contemplan plantas, tejidos vegetales, y células vegetales se transforman con o se cruzan para que contengan un polinucleótido. Las plantas se puede utilizar para producir composiciones vacunales de influenza y las vacunas se pueden administrar por medio del consumo de la planta (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N<sup>os</sup> 5.484.719 y 6.136.320).

La divulgación también se refiere a kits para detectar un virus o diagnosticar una infección por un virus. Un kit puede comprender un anticuerpo que se una específicamente a un virus de influenza, o una porción antigénica del mismo. Un kit puede comprender uno o más polipéptidos o péptidos. Los polipéptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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 o variante funcional y/o inmunogénico de la misma. Un kit puede comprender uno o más polinucleótidos u oligonucleótidos. Los polinucleótidos pueden tener una secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N<sup>os</sup> 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. Opcionalmente un kit puede comprender uno o más anticuerpos de control, polipéptidos o péptidos de control, y/o polinucleótido u oligonucleótido de control. El anticuerpo, polipéptidos, péptidos, polinucleótidos y/u oligonucleótidos del kit se pueden proporcionar en un contenedor o envase adecuado.

La divulgación también se refiere al uso de perros mestizos como modelo para la infección y la patogénesis del virus de influenza. Se puede inocular a un perro mestizo con un virus de influenza, tal como un virus de influenza canina. Opcionalmente, al perro mestizo se le pueden administrar agentes terapéuticos posteriormente a la inoculación. Al perro también se le puede administrar una composición para generar una respuesta inmunitaria contra el virus de influenza antes de la inoculación del virus. Se pueden obtener tejido, sangre, suero y otras muestras biológicas antes y/o después de la inoculación y examinarse la presencia de virus y la patogénesis en el tejido utilizando métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a estos, PCR, RT-PCR, secuenciación de ácido nucleico, e inmunohistoquímica.

Las cepas de virus de influenza (designados como "A/canine/Florida/43/2004" y "A/canine/Florida/242/ 2003") se depositaron en la Colección de cultivos tipo americana (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 9 de octubre de 2006. Las cepas de virus de influenza (designadas como "canine/Jax/05" y "canine/Miami/05"), se depositaron en la Colección de cultivos tipo americana (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 17 de octubre de 2006. Las cepas víricas se han depositado bajo condiciones que aseguran que el acceso a los cultivos estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente para el Comisionado de Patentes y Marcas que se intitula bajo las disposiciones 37 CFR 1.14 and 35 U.S.C. 122. El depósito estará disponible a requerimiento de las leyes de patente extranjeras en países donde se presenten equivalentes de la solicitud objetivo o su progenie. Sin embargo, se debería entender que la disponibilidad de un depósito no constituye un permiso para practicar el objetivo de la invención en derogación de los derechos de patente garantizados por la acción gubernamental.

Además, los virus objetivo depositados se almacenarán y estarán disponibles para el público de acuerdo con las estipulaciones de Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, es decir, que se almacenará con todo el cuidado necesario para mantenerlo viable y sin contaminar durante un periodo de al menos cinco años después del requerimiento de suministro más reciente de una muestra del depósito, y en cualquier caso, durante un periodo de al menos treinta (30) años después de la fecha del depósito o por la vida aplicable de cualquier patente que pueda publicarse que desvela el cultivo. El depositario reconoce la obligación de reemplazar el depósito cuando el depositario sea incapaz de suministrar una muestra cuando se le requiera, debido a la condición del depósito. Todas las restricciones sobre la disponibilidad pública del depósito del cultivo objeto serán retiradas irrevocablemente en garantía de una patente que la desvela.

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 influenza canina identificado como A/canine/Florida/ 43/2004 (Ca/ Fla/43/04) con aislados equinos H3N8, así como el aislado canine/Florida/242/ 2003.

En tanto que los siguientes ejemplos relatan la materia objeto de las reivindicaciones, tales son ilustrativos de la presente invención. Por otra parte, los ejemplos se proporcionan solamente con fines informativos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS PARA LOS EJEMPLOS 1-6

##### Recolección de sangre y torundas nasales de galgos Greyhounds

Se recolectaron muestras de sangre en fase aguda y convaleciente por venopunción yugular de galgos Greyhounds clínicamente normales y enfermos en perreras de carreras que habían experimentado brotes de enfermedad respiratoria. Las muestras de fase convaleciente se recogieron de 4 a 12 semanas después de las muestras en fase aguda. Se extrajo el suero y se almacenó a -80 °C. Las torundas nasales se recolectaron y se colocaron en medio de transporte Amies con carbón vegetal (Becton Dickinson Biosciences) en espera de someterlas a aislamiento bacteriano.

##### Examen post-mortem de los galgos Greyhounds

Se llevaron a cabo los exámenes post-mortem completos en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida (UF CMV) en 5 de los 8 galgos Greyhounds que murieron en el brote de enero de 2004 en el canódromo de Florida. El examen post-mortem de otro perro se llevó a cabo en una clínica veterinaria privada con remisión de tejidos a la UF CMV para el diagnóstico histopatológico. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se embebieron en parafina, y se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina eosina para el diagnóstico histopatológico o bien se procesaron para inmunohistoquímica como se describe posteriormente. Los tejidos sin fijar se sometieron a cultivo bacteriano y también se almacenaron a -80 °C.

##### Ensayos serológicos de los patógenos víricos respiratorios caninos

Muestras emparejadas de suero en fase aguda y convaleciente se remitieron al Laboratorio de Diagnóstico de Salud Animal (AHDL) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cornell para los ensayos de neutralización del suero contra virus de moquillo canino, adenovirus tipo 2, y virus de parainfluenza. Los títulos de anticuerpos se expresaron como la última dilución de suero que inhibía la infección vírica de cultivos celulares. La seroconversión, que se define como un aumento del título de anticuerpos de  $\geq 4$  veces el título de anticuerpos entre la muestra aguda y la convaleciente, indicaba la infección vírica. No se detectó ninguna seroconversión en estos patógenos víricos.

##### Ensayos microbianos de patógenos bacterianos respiratorios caninos

Parejas de torundas nasales y tejidos post-mortem se remitieron al Servicio de Diagnóstico Clínico Microbiológico/Parasitológico/Serológico de la UF CMV para el aislamiento e identificación bacteriana. Las muestras se cultivaron en medios no selectivos así como en medios selectivos para especies de *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel) y especies de *Mycoplasma* (Remel). Todos los cultivos se mantuvieron durante 21 días antes de informar de crecimiento negativo. Las torundas nasales de algunos galgos Greyhounds se remitieron también al departamento

de diagnóstico de medicina/patobiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Kansas para su cultivo bacteriano. De los 70 perros clínicamente enfermos ensayados, se aisló *Bordetella bronchiseptica* de la cavidad nasal de 1 perro, mientras que se recuperó *Mycoplasma spp.* de la cavidad nasal de 33 perros. Se recuperó *Pasteurella multocida* comúnmente de la cavidad nasal de perros con descarga purulenta nasal. Dos de los

5 perros que habían muerto en el brote de enero de 2004 tenían escaso crecimiento de *Escherichia coli* en los pulmones post-mortem, 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 los perros que murieron.

#### 10 Aislamiento de virus en los tejidos post-mortem

Los tejidos congelados se descongelaron y se homogenizaron en 10 volúmenes de medio mínimo esencial (MEM) suplementado con un 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) y antibióticos. Los desechos sólidos se retiraron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en cultivos celulares o en embriones de pollo de 10 días de edad.

15 Los homogenizados de tejido de los galgos Greyhounds que murieron se inocularon en diversos cultivos celulares que soportaban la replicación de un amplio intervalo de patógenos víricos. Los cultivos celulares incluían Vero (células epiteliales de mono verde africano, ATCC N° CCL-81), A-72 (fibroblastos tumorales caninos, CRL-1542), HTR-18 (células epiteliales de recto humano, 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

20 suplementado con 2,5 ug/ml de tripsina tratada con TPCK (Sigma); el resto de líneas celulares se cultivaron en MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino y antibióticos. Las células se cultivaron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. Un cultivo de control se inoculó con el MEM suplementado. Los cultivos se observaron diariamente para ver cambios morfológicos y se recolectaron a los 5 días tras la

25 inoculación. Los fluidos recolectados y las células se clarificaron por centrifugación y se inocularon en células nuevas como se describió para la inoculación inicial; se llevaron a cabo dos pasajes ciegos. Se determinó la actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados utilizando glóbulos rojos de pollo o pavo como se había descrito (Burleson y col., 1992; Kendal y col., 1982).

#### 30 RT-PCR, secuenciación de nucleótidos, y análisis filogenéticos

Se extrajo el ARN total del sobrenadante del cultivo tisular o fluido alantoideo utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ARN total (10 ng) se transcribió inversamente a ADNc utilizando el kit RT-PCR de una etapa (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se realizó la

35 amplificación PCR de la región codificante de 8 genes de virus de la influenza como se había descrito anteriormente (Klimov y col., 1992a), utilizando grupos de cebadores específicos del gen universales. Las amplificaciones de ADN resultantes se utilizaron como matrices para la secuenciación automática en un secuenciador automático de ADN Applied Biosystems 3100 utilizando un terminador químico de secuenciación cíclica con tinción (ABI). Las

40 secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando el GCG Package©, Versión 10.0 (Accelrys) (Womble, 2000). Se utilizó el Phylogeny Inference Package© Version 3.5 para estimar la filogenia y calcular los valores bootstrap de las secuencias de nucleótidos (Felsenstein, 1989). Los árboles filogenéticos se compararon con los generados en el análisis de unión de vecinos con el modelo gamma de Tamura-Nei implementado en el programa MEGA© (Kumar y col., 2004) y confirmado por el programa PAUP© 4.0 Beta (Sinauer Associates).

#### 45 Inoculación experimental de perros

Se utilizaron cuatro beagles libres de patógenos de 6 meses de edad [(2 machos y 2 hembras (Liberty Research)]. La exploración física y los ensayos de sangre básicos incluyendo el recuento celular sanguíneo completo/diferencial, el panel bioquímico sérico, y el análisis de orina determinaron que los animales estaban sanos. Se alojaron juntos en

50 unas instalaciones mejoradas BSL-2 acreditadas por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Se registraron las temperaturas rectales básicas dos veces al día 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 la intubación con tubos endotraqueales. A cada perro se le inoculó una dosis total de 10<sup>6,6</sup> de dosis infecciosa de cultivo celular media (TCID<sub>50</sub>) de virus A/Canine/Florida/43/2004 (Canine/FL/04)

55 (H3N8) con la mitad de la dosis administrada en la tráquea distal por medio del tubo endotraqueal y la otra mitad se administró en la profundidad de la fosa nasal por medio de un catéter. Se realizaron exploraciones físicas y registros de la temperatura rectal dos veces al día durante 14 días tras inoculación (p.i.). Se recolectaron muestras de sangre (4 ml) por venopunción yugular los días 0, 3, 5, 7, 10, y 14 p.i. Los especímenes nasales y orofaríngeos se recolectaron con torundas de poliéster (Fisher Scientific) de cada perro los días 0 to 5, 7, 10, y 14 p.i. Las torundas

60 se colocaron en medio de transporte vírico (Remel) y se almacenaron a -80 °C. Se eutanasiaron 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 restantes 2 perros el día 14 para el examen post-mortem. Los tejidos se procesaron para los análisis histológicos como se ha descrito. Los tejidos para los cultivos víricos se almacenaron a -80 °C. Este estudio se aprobó por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de

65 Florida.

Supresión vírica de los perros inoculados experimentalmente

Las diluciones seriadas de los homogenados pulmonares y los extractos de las torundas, preparados por clarificación del medio de transporte de las torundas por centrifugación, se agruparon en MEM suplementado con 0,5% de BSA y antibióticos. Se llevaron a cabo ensayos de placa que se habían descrito (Burleson y col., 1992) utilizando monocapas de células MDCK en placas de cultivo tisular de 6 pocillos. Las monocapas celulares inoculadas se cubrieron con MEM suplementado que contenía 0,8% de agarosa y 1,5 ug/ml de tripsina-TPCK. Las células se cultivaron durante 72 horas a 37 °C en atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> antes de su fijación y tinción con cristal violeta. La concentración de virus se expresó como unidades formadoras de placas (UFP) por gramo de tejido o por torunda.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido pulmonar desparafinadas y rehidratadas de 5 µm de los galgos Greyhounds y beagles se montaron en portaobjetos Bond-Rite™ (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) y posteriormente se trataron con proteinasa K (DakoCytomation, Carpinteria, CA) seguido del tratamiento con reactivo de bloqueo peroxidasa (Dako® EnVision™ Peroxidase Kit, Dako Corp.). Las secciones se incubaron con diluciones 1:500 de anticuerpos monoclonales de virus de moquillo canino (VMRD, Inc.), adenovirus tipo 2 (VMRD, Inc.), virus de la parainfluenza canina (VMRD, Inc.), o influenza A H3 (Chemicon International, Inc.) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los controles incluían la 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 normal. A continuación del tratamiento con los anticuerpos primarios, las secciones se incubaron con una inmunoperoxidasa secundaria y reactivos sustrato de peroxidasa (Dako® EnVision™ Peroxidase Kit, Dako Corp.) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se contra-tiñeron con hematoxilina, se trataron con Clarifier nº2 y Reactivo Bluing (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), se deshidrataron, y se aplicaron los cubreobjetos con Permount (ProSciTech).

Ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI)

Las muestras de suero se incubaron con la 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 influenza A/Canine/FL/04 (H3N8) se cultivó en células MDCK durante 36-48 h a 37 °C. Los sobrenadantes de los cultivos víricos se recolectaron, se clarificaron por centrifugación, y se almacenaron a -80 °C. El ensayo HI se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (Kendal, y col., 1982). En resumen, 4 unidades hemaglutinantes del virus en 25 µl se añadieron a un volumen igual de suero diluido seriadamente en pocillos microtiter y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió un volumen igual de eritrocitos de pavo 0,5% (v/v) y se estimaron los títulos de hemaglutinación visualmente tras 30 minutos. El punto final de título de HI se definió como la última dilución de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. Se definió la seroconversión como el aumento de  $\geq 4$  veces del título de HI entre las muestras aguda y convaleciente. La seropositividad de una única muestra se definió como un título de anticuerpos HI  $\geq 1:32$ .

Ensayo de microneutralización (MN)

Se detectaron las respuestas de neutralización de los anticuerpos del suero frente a A/Canine/FL/04 (H3N8) por medio del ensayo MN como se había descrito anteriormente (Rowe y col., 1999) excepto en que los sueros caninos que se trataron con RDE como se ha descrito anteriormente antes del ensayo. El punto final de título se definió como la dilución más alta del suero que dio el 50% de neutralización de 100 TCID<sub>50</sub> de virus. Se definió la seroconversión como el aumento de  $\geq 4$  veces del título MN entre la pareja de muestras convaleciente y aguda. La seropositividad de una única muestra se definió como un título de MN  $\geq 1:80$ .

A continuación los ejemplos ilustran los procedimientos para la práctica de la invención y la divulgación que la acompaña. Estos ejemplos no se tienen que tomar como limitantes. Todos los porcentajes son por peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son por volumen, a menos de que se indique otra cosa.

**Ejemplo 1**

En enero de 2004, se produjo un brote de enfermedad respiratoria en 22 galgos Greyhounds de carreras alojados en dos perreras en el canódromo de Florida y la granja local que suministraba los perros a estas perreras. Había aproximadamente 60 perros en cada edificio de las perreras y 300 perros en la granja. El brote se produjo en un periodo de 6 días tras el cual no se identificaron nuevos casos. Catorce de los 22 perros tenía fiebre de 39,5 a 41 °C, una tos leve con arcadas durante 10 a 14 días, y recuperación eventual. De los 8 perros restantes, 6 perros aparentemente sanos murieron inesperadamente con hemorragia por la boca y la nariz. Los otros dos perros se eutanasiaron a las 24 horas de la aparición de hemorragia por la boca debido a su rápido deterioro. Ambos perros tenían fiebre de 41 °C. Cuatro de las 8 muertes se produjeron en los edificios de las perreras y cuatro en la granja. El cincuenta por ciento de las muertes se produjeron el día 3 del brote. Los 22 perros variaban de edad entre 17 meses a 4 años, pero el 73% tenían de 17 a 33 meses de edad.

Eran evidentes dos síndromes clínicos: una enfermedad más leve caracterizada por fiebre inicial y luego tos durante 10-14 días (14 perros) con recuperación posterior, o muerte peraguda asociada con hemorragia en el tracto respiratorio (8 perros con una tasa de mortalidad de 36%). Se llevaron a cabo los exámenes post-mortem en 6 de los 8 casos fatales. Todos los perros tenían hemorragia masiva 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 supurativa (Figura 3). El revestimiento epitelial en estos tejidos y la luz de las vías aéreas estaban infiltrados con neutrófilos y macrófagos. Los homogenados pulmonares preparados de estos perros se inocularon en una variedad de líneas celulares humanas, de mono, bovina y canina, para el cultivo de los virus. El homogenado pulmonar de un perro produjo efectos citopáticos en células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas en presencia de tripsina, y el sobrenadante del cultivo aglutinaba glóbulos rojos de pollo. Se proporcionó una prueba preliminar de virus de influenza tipo A por un ELISA comercial para detección de nucleoproteína de virus de influenza A y B, y por análisis PCR utilizando cebadores específicos del gen de la matriz de virus de la influenza A. Además, la actividad de hemoaglutinación se inhibió por antisuero de referencia para la influenza A equina subtipo H3, pero no por el antisuero específico para la influenza A humana 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 ARN del genoma vírico. Las comparaciones de secuencia con los genes de virus de influenza conocidos y análisis filogenético indicaron que los 8 genes del aislado canino eran similares a los virus contemporáneos de la influenza A equina (H3N8), con los que comparte  $\geq 96-97\%$  de identidad de secuencia (Figura 1 A, Tabla 4). Por el contrario, los genes representativos de aislados de influenza A aviar, porcina y humana tenían  $\leq 94\%$  de identidad con el aislado canino (Tabla 4). Estos datos identificaron el aislado canino A/Canine/ Florida/ 43/ 2004 (Canine/FL/04) como virus de influenza H3N8 estrechamente relacionado con los linajes contemporáneos de virus de influenza equina. Como todos los genes del aislado canino tenían su origen en el virus de influenza equina, los inventores concluyeron que el genoma completo de un virus de influenza equino se había transmitido al perro.

### Ejemplo 2

Para investigar el papel del virus Canine/FL/04 en las observaciones clínicas y patológicas en los galgos Greyhounds, los inventores llevaron a cabo una tinción inmunohistoquímica (IHC) de los tejidos de pulmón utilizando un anticuerpo monoclonal contra la influenza A H3. El antígeno vírico H3 se detectaba consistentemente en el citoplasma de las células epiteliales bronquiales y bronquiolares, células epiteliales de glándulas bronquiales y macrófagos de la luz de las vías aéreas y espacios alveolares (Figura 2 A). Estos datos apoyan un diagnóstico de infección por virus de influenza del subtipo H3 en múltiples perros.

### Ejemplo 3

Para determinar la implicación de un virus similar al Canine/FL/04 en la etiología del brote de enfermedad respiratoria, los inventores analizaron suero emparejado agudo y convaleciente de 11 perros enfermos y 16 contactos asintomáticos por inhibición de hemaglutinación (HI) y microneutralización (MN). La seroconversión, definida como el aumento de  $\geq 4$  veces el título de anticuerpos contra Canine/FL/04 desde la fase aguda a la convaleciente, se produjo en 8 de los 11 (73%) perros enfermos en ambos ensayos (Tabla 1). La seroconversión se produjo en 6 de 16 (38%) contactos asintomáticos en el ensayo HI, mientras que 8 de 16 (50%) presentaban seroconversión en el ensayo MN (Tabla 1). Los datos de seroconversión demostraban la infección de los perros con un virus similar a Canine/FL/04 lo que coincidía temporalmente con la aparición de la enfermedad respiratoria en la mayoría de los animales.

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

### Ejemplo 4

Para entender mejor la capacidad del virus Canine/FL/04 para infectar perros, se inocularon cada uno de cuatro beagles de 6 meses de edad criados para estos fines, con  $10^{6.6}$  dosis infecciosas medias de cultivo tisular (TCID<sub>50</sub>) por las rutas intratraqueal e intranasal. Todos los perros desarrollaron fiebre (temperatura rectal  $\geq 39$  °C) a los dos días tras la inoculación (p.i.) pero ninguno mostró síntomas respiratorios tales como tos o descarga nasal durante un periodo de observación de 15 días. Se examinó la eliminación del virus por cuantificación del virus en torundas nasal y orofaríngeas. Solo 2 de los 4 perros eliminaban cantidades detectables de virus. Un perro eliminaba virus los días 1 y 2 p.i. ( $1.0-2.5 \log_{10}$  UFP por torunda), mientras que el otro perro eliminaba virus durante 4 días consecutivos tras la inoculación ( $1.4-4.5 \log_{10}$  UFP por torunda). El examen post-mortem de 2 perros el día 5 p.i. revelaron traqueítis necrotizante e hiperplásica, bronquitis y bronquiolitis similar a la encontrada en la enfermedad espontánea en galgos



Greyhounds, pero no había hemorragia pulmonar ni bronconeumonía. El antígeno vírico H3 se detectó en el citoplasma de las células epiteliales de bronquios, bronquiolos, y glándulas bronquiales por IHC (Figura 2B). Se recuperó virus infeccioso del tejido pulmonar de uno de los perros. El examen post-mortem de los restantes 2 perros el día 14 p.i. mostraba cambios histológicos mínimos en los tejidos respiratorios, ni antígeno vírico H3 por IHC, ni se recuperó virus los homogenados de pulmón. La seroconversión en estos 2 últimos perros se detectó en ensayos MN el día 7 p.i., con un aumento de más de 2-3 veces en los títulos de anticuerpo el día 14. Estos resultados establecieron la susceptibilidad de los perros a la infección por Canine/FL/04, como se evidenció por la respuesta febril, la presencia de antígeno vírico y los virus infecciosos en el parénquima pulmonar, los hallazgos histopatológicos típicos de influenza, y la seroconversión. El fallo de reproducir la enfermedad grave y la muerte en los beagles inoculados experimentalmente no es sorprendente debido a la gran proporción de galgos Greyhounds infectados naturalmente que eran asintomáticos.

### Ejemplo 5

Para investigar si un virus de influenza similar a Canine/FL/04 había circulado entre las poblaciones de galgos Greyhounds en Florida antes del brote de enero de 2004, se ensayaron sueros de archivo de 65 galgos Greyhounds de carreras para detectar la presencia de anticuerpos contra Canine/FL/04 utilizando ensayos HI y MN. No había anticuerpos detectables en las muestras de 33 perros desde 1996 a 1999. De 32 perros que se muestrearon 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 localizaban en el canódromo de Florida implicados en brotes de enfermedad respiratoria de etiología desconocida de 1999 a 2003, sugiriendo que un virus similar al Canine/FL/04 pudo haber sido el agente causal de esos brotes. Para investigar más esta posibilidad, los inventores examinaron tejidos de archivo de galgos Greyhounds que murieron de bronconeumonía hemorrágica en marzo de 2003. Los homogenados de pulmón de un perro inoculados en células MDCK y embriones de pollo dieron lugar a virus de influenza H3N8, denominado A/Canine/Florida/242/2003 (Canine/FL/03). El análisis de secuencia del Canine/FL/03 reveló > 99% de identidad con el Canine/FL/04 (Tabla 4) indicando que virus similares a Canine/FL/04 habían infectado los galgos Greyhounds antes de 2004.

### Ejemplo 6

De junio a agosto de 2004, se produjeron brotes de enfermedad respiratoria en miles de galgos Greyhounds de carreras en 14 canódromos de Florida, Texas, Alabama, Arkansas, Virginia Oeste, y Kansas.

Los Oficiales en algunos de estos canódromos estimaban que al menos el 80% de su población de perros tenían la enfermedad clínica. La mayoría de los perros tenía signos clínicos de fiebre ( $\geq 39$  °C) y tos similar al brote de los perros de enero de 2004, pero muchos perros también tenían descarga nasal mucopurulenta. Se informaron muertes múltiples pero no se pudo determinar una tasa de mortalidad precisa.

Los inventores recolectaron sueros emparejados agudos y convalecientes de 94 perros localizados en 4 canódromos de Florida: el 56% de estos perros tenían  $\geq 4$  veces más de títulos de anticuerpos contra Canine/FL/04, y el 100% eran seropositivos (Tabla 6). Los sueros convalecientes de 29 perros de Virginia Oeste y Kansas también tenían anticuerpos contra Canine/FL/04. Los inventores aislaron virus de influenza A (H3N8) de los pulmones de un galgo Greyhound que murió de bronconeumonía hemorrágica en el canódromo de Texas. El análisis de secuencia del genoma completo de este aislado, denominado A/Canine/Texas/1/2004 (Canine/TX/04), reveló  $\geq 99\%$  de identidad con el Canine/FL/04 (Tabla 4). El aislamiento de tres virus de influenza estrechamente relacionados de casos caninos fatales durante un periodo de 13 meses y de diferentes localizaciones geográficas, junto con la evidencia serológica sustancial de la diseminación de la infección entre los galgos Greyhounds de carreras, sugerían una circulación sostenida de un virus similar Canine/FL/04 en la población de perros.

El análisis filogenético de los genes HA de Canine/FL/03, Canine/FL/04 y Canine/TX/04, mostró que constituían un grupo monofilético con un soporte bootstrap robusto que era claramente distintivo de los genes H3 contemporáneos de los virus equinos aislados en 2002 y 2003 (Figura 1B). Los análisis filogenéticos y las comparaciones de secuencias de nucleótidos por pares de los otros 7 segmentos genómicos apoyaban la segregación de los genes caninos como un sub-linaje distinto más estrechamente relacionado con el linaje del virus equino (datos no mostrados, y Tabla 4). El agrupamiento de los genes de influenza canina como un grupo monofilético separado de la influenza equina se apoyaba también en la presencia de 5 cambios de señal de aminoácidos en la HA (Tabla 2). Junto con los resultados serológicos de 2003 y 2004, estos datos son consistentes con un evento de transmisión de un único virus de caballos a perros, con la diseminación horizontal posterior del virus en la población de galgos Greyhounds. Sin embargo, no se pueden excluir formalmente las introducciones repetidas de este único linaje de virus de influenza a partir de una especie reservorio no identificada, que aunque es improbable, podría ser.

La HA es un determinante crítico de especificidad de especie del virus de la influenza (Suzuki y col., 2000). Para identificar restos de HA que se pueda asociar con la adaptación al huésped canino, los inventores compararon la secuencia deducida de aminoácidos de HA canina con la de virus equinos contemporáneos. Cuatro cambios de aminoácidos diferencian las secuencias de consenso de HA maduras equina y canina: N83S, W222L, I328T, y N483T (véase la Tabla 2). Los virus caninos tienen una eliminación al compararse con las secuencias equinas de

consenso. Por lo tanto, la posición 7 de aminoácido en la secuencia de la HA equina es la posición 6 en la secuencia de HA canina, la posición de aminoácido en la posición 29 en la secuencia de HA equina es la posición 28 en la secuencia de HA canina, la posición 83 en la secuencia de HA equina es la posición 82 en la secuencia de HA canina, etc. Por tanto, los cuatro aminoácidos sustituidos están en las posiciones 82, 221, 327, y 482 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N° 33 y SEC ID N° 34. La sustitución de serina por asparagina en la posición 83 de la secuencia de consenso es un cambio de significado funcional desconocido aunque se encuentran varios restos polares en las moléculas de H3 de otras especies. La isoleucina estrictamente conservada en la posición 328 de la secuencia de consenso cerca del sitio de escisión de HA H3 se ha remplazado por treonina. El papel fundamental de la escisión HA por proteasas del huésped en la patogénesis sugiere que este cambio merece más estudios. La sustitución de leucina por triptófano en la posición 222 de la secuencia de consenso es bastante importante debido a que representa un cambio no conservador adyacente al bolsillo de unión del ácido siálico, el cual podría modular la función de receptor (Weis y col., 1988). Es interesante que la leucina en la posición 222 no es única para el H3HA canino ya que se encuentra típicamente en los subtipos de HA: H4, H8, H9, y H12 (Nobusawa y col., 1991; Kovacova y col., 2002). La sustitución de leucina puede ser más compatible con la especificidad de virus para huéspedes mamíferos ya que se ha informado de infecciones víricas de cerdos con el subtipo H4 (Karasin y col., 2000) y seres humanos y cerdos con el subtipo H9 (Peiris y col., 1999). La sustitución de asparagina con treonina en la posición 483 de la secuencia de consenso resultaba en pérdida de un sitio de glucosilación en la subunidad HA2 que se conserva en todos los subtipos HA (Wagner y col., 2002). Aunque la importancia de estos cambios de aminoácidos en la HA para la adaptación de un virus equino a los perros permanece sin determinar, cambios de aminoácidos similares se han observados previamente en asociación con la transferencia interespecie (Vines y col., 1998; Matrosovich y col., 2000). Las diferencias entre otras proteínas víricas de la influenza de la invención y la secuencia equina de consenso se muestran en las Tablas 19 a 25.

La fuente del virus de la influenza equina que infectó inicialmente los galgos Greyhounds de carreras permanece especulativa. Las perreras en los canódromos de galgos Greyhounds de carreras no se localizan cerca de caballos o de hipódromos, lo que sugiere que el contacto entre los galgos Greyhounds y los caballos que los eliminaban no es una explicación suficiente para los múltiples brotes de 2004. Una fuente potencial de exposición al virus equino es la alimentación de los galgos Greyhounds con carne de caballo, cuya dieta se suplementa con carne cruda suministrada por las casas de envasado que tienen carcasas, incluidas de caballos que podrían portar la influenza. Precedentes de este modo de infección incluyen los informes de la transmisión interespecie del virus de influenza aviar H5N1 a los cerdos y a los félidos de zoo alimentados con las carcasas de pollo infectadas (Webster, 1998; Keawcharoen y col., 2004; Kuiken y col., 2004). Aunque esto es una ruta plausible para la introducción inicial de la influenza equina en los perros, esto no explica los brotes múltiples recientes de influenza en miles de perros en diferentes estados. El estudio de inoculación experimental de los inventores demostró la presencia del virus en las fosas nasales y orofaringe de los perros, aunque con títulos modestos. No obstante, estos resultados indican que es posible la eliminación, y que la transmisión del virus de perro a perro por grandes gotas en aerosol, fómites, o contacto mucoso directo podría tener un papel en la epizootiología de la enfermedad.

La transferencia interespecies de un virus entero de influenza de mamífero a una especie de mamífero no relacionada es un acontecimiento raro. Los estudios previos han proporcionado una evidencia serológica o virológica limitada, pero no ambas, de infección transitoria de perros con virus de la influenza A humana (H3N2) (Nikitin y col., 1972; Kilbourne, y col., 1975; Chang y col., 1976; Houser y col., 1980). Sin embargo, no hay evidencia de circulación sostenida en el huésped canino. Aunque está bien documentada la transferencia directa de los virus de influenza porcina de los cerdos a la gente - (Dacso y col., 1984; Kimura y col., 1998; Patriarca y col., 1984; Top y col., 1977), no hay evidencia de la adaptación de los virus porcinos en huéspedes humanos. En este informe los inventores proporcionan evidencias virológicas, serológicas, y moleculares de la transmisión de un virus completo de la influenza A (H3N8) equina a otra especie de mamífero, el perro. Las sustituciones únicas de aminoácidos en la HA del virus canino, junto con la confirmación serológica de infección de perros en múltiples estados de los EE. UU., sugieren una adaptación del virus al huésped canino. Como los perros son un animal de compañía primario para seres humanos, estos hallazgos tienen implicaciones para la salud pública; los perros pueden proporcionar una nueva fuente de transmisión de nuevos virus de influenza A a los seres humanos.

**Tabla 1.** Respuesta de anticuerpos contra A/Canine/Florida/43/2004 (H3N8).

Respuesta	Perros enfermos (11) <sup>a</sup>		Contactos sanos (16) <sup>b</sup>	
	HI <sup>c</sup>	MN <sup>d</sup>	HI	MN
Seroconversión (%) <sup>e</sup>	73	73	38	50
Seropositivos (%) <sup>f</sup>	82	82	100	100
Media geométrica del título <sup>g</sup>	329	424	268	431

<sup>a</sup> Número de perros con signos clínicos de enfermedad

<sup>b</sup> Número de perros asintomáticos alojados en contacto con los perros clínicamente enfermos.

<sup>c</sup> Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando virus A/Canine/Florida/43/2004.

<b>Tabla 1.</b> Respuesta de anticuerpos contra A/Canine/Florida/43/2004 (H3N8).		
	<b>Perros enfermos (11)<sup>a</sup></b>	<b>Contactos sanos (16)<sup>b</sup></b>
<sup>d</sup> Ensayo de microneutralización (MN) utilizando virus A/Canine/Florida/43/2004.		
<sup>e</sup> Porcentaje de perros con al menos un aumento de 4 veces en el título de anticuerpos en sueros agudos y convalecientes emparejados.		
<sup>f</sup> Porcentaje de perros con un título positivo de anticuerpos (título HI ≥ 32: título MN ≥ 80) en el suero de convalecientes.		
<sup>g</sup> Media geométrica del título de anticuerpos para el suero de convalecientes.		

<b>Tabla 2.</b> Diferencias de aminoácidos entre las hemaglutininas de H3 canino y equino.				
<b>H3 Equino de consenso</b>	<b>Can/FL/03</b>	<b>Can/FL/04</b>	<b>Can/TX/04</b>	<b>Significación funcional potencial</b>
G7*	D	- †	-	D también se encuentra en HA H3 del pato y de seres humanos
129	-	M	M	I se conserva en HA H3 de todas las especies
N83	S	S	S	Hay varios aminoácidos polares presentes en esta posición en HA H3 de otras especies
S92	-	N	-	N está presente en algunos HA H3 del pato.
L118	-	-	V	L se conserva en todos los HA H3
W222	L	L	L	W se conserva en la mayoría de HA H3 de todas las especies; localizado 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 todos los HA H3 aviares, porcinos o humanos
N483	T	T	T	N se produce en todos los H3 y otros subtipos HA. La sustitución da como resultado la pérdida de un sitio de glucosilación.
K541	-	R	-	Cambio de aminoácido conservador básico
* Resto de aminoácido (código de una sola letra) y posición en HA H3 madura. El código de aminoácidos es: A=alanina, D= ácido aspártico, G=glicina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M= metionina, N=asparagina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptófano. † Denota que no hay cambios con la HA H3 de consenso equino.				

<b>Tabla 3.</b> Inhibición de la hemaglutinación de un virus aislado por antisuero de referencia contra diferentes subtipos de HA		
<b>Antisuero de referencia</b>	<b>Especificidad de HA</b>	<b>Título de IH<sup>a</sup></b>
Puerto Rico/8/34	H1	5
Swine/Iowa15/30	H1	5
Singapore/01/57	H2	5
Shanghai/11/87	H3 <sup>b</sup>	5
Equine/Miami/1/63	H3	160
Duck/Czechoslovakia/56	H4	5
Tern/South Africa/61	H5	5
Turkey/Massachusetts/65	H6	5

**Tabla 3.** Inhibición de la hemaglutinación de un virus aislado por antisuero de referencia contra diferentes subtipos de HA

Antisuero de referencia	Especificidad de HA	Título de IH <sup>a</sup>
Fowl Plague/Dutch/27	H7	5
Fowl Plague/Rostock/34	H7	5
Equine/Prague/1/56	H7	5
Turkey/Ontario/6118/68	H8	5
Quail/Hong Kong/G1/97	H9 <sup>b</sup>	5
Chicken/Hong Kong/G9/97	H9 <sup>b</sup>	5
Chicken/Germany/49	H10	5
Duck/England/56	H11	5
Gull/Maryland/704/77	H13	5
Suero normal de oveja	-	5
Suero normal de hurón	-	5

<sup>a</sup> Título de inhibición de la hemaglutinación para el virus aislado del perro n° 43.  
<sup>b</sup> Antisueros policlonales producidos en hurones, mientras que todos los otros antisueros se producían en ovejas o cabras.

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

Gen	Equino	Aviar	Porcino	Humano
PB2 DQ124147	96,9 (98,7) <sup>a</sup> Eq/Kentucky/2/8 M73526	88,6 (96,8) Mall/Alberta/98/85 AY633315	87,9 (96,8) Sw/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) Ck/BritishColumbia/04 (Gull/Md/704/77) AY61675 (M25933)	83,9 (97,1) Sw/Korea/S 109/04 (Sw/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) Ck/Chile/4591/02 (Ostrich/SA/08103/95) AY303660(AF508662)	84,3 (94,6) Sw/Hong Kong/ 126/02 M26081	83,8 (93,4) Taiwan/2/70 (Viet Nam/ 1203/04) AY210199 (AY818132)
HA (H3) DQ124190	97,4(97,1) Eq/FL/1/93 L39916	80,7 (89,0) Dk/Norway/1/03 AJ841293	80,0 (87,7) Sw/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) Ck/Chile/176822/02 AY303658	85,4 (93,5) Sw/Ontario/42729a/01 (Sw/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 L06583	84,0 (85,2) Dk/NJ/2000 L06583	b na <sup>b</sup>	na <sup>b</sup> na

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

Gen	Equino	Aviar	Porcino	Humano
M DQ124152	97,9 (95,7) Eq/Tennessee/5/86 (Eq/Kentucky/92) M63529 (AF001683)	94,1 (94,0) Tky/Mn/833/80 AF001683	93,7 (93,5) Sw/Saskatchewan/ 18789/02 M63527	91,2 (95,4) WSN/33 (Hong Kong/ 1073/99) J02177 (AJ278646)
NS DQ124153	97,5 (95,7) Eq/Tn/5/86 (Eq/Kentucky/92) M80973 (AF001671)	92,0 (90,4) Mal/NY/6750/78 M80945	91,1 (89,1) Sw/China/8/78 (Sw/Korea/s452/04) M80968 (AY790309)	91,4 (90,0) Brevig Mission/1/18 AF333238

<sup>a</sup> Porcentaje de identidad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (entre paréntesis) de genes del virus A/Canine/Florida/43/2004 (H3N8) con el gen más homólogo de aislados víricos del virus de la influenza de las especies, seguido por sus números de registro de la base de secuencias GenBank  
<sup>b</sup> No aplicable: La neuraminidasa N8 no se ha informado nunca en virus humanos o porcinos

**Tabla 5.** Títulos de anticuerpos contra A/canine/Florida/43/2004 (H3N8) en el suero de galgos Greyhounds recolectado de 1996 a 2003.

	Año <sup>a</sup>					
	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
Títulos de anticuerpos <sup>b</sup>				512	232, 524	280-2242

<sup>a</sup> El año de recolección de muestras de suero de galgos Greyhounds de carreras en Florida.  
<sup>b</sup> Ensayo de microneutralización de los títulos de anticuerpos para perros seropositivos, incluyendo el intervalo para los seis perros seropositivos de 2003.

**Tabla 6.** Respuesta de anticuerpos contra A/canine/Florida/43/2004 (H3N8) en galgos Greyhounds de carreras en 4 canódromos en junio de 2004.

Respuesta	Canódromo A	Canódromo B	Canódromo C	Canódromo D
Número de perros ensayados <sup>a</sup>	37	10	22	25
Seroconversión (%) <sup>b</sup>	46	90	100	64
Seropositivo (%) <sup>c</sup>	100	100	100	100
Media geométrica del título <sup>d</sup>	401	512	290	446

<sup>a</sup> Número de perros clínicamente enfermos ensayados de IH utilizando el A/canine/Florida/43/2004 (H3N8).  
<sup>b</sup> Porcentaje de perros con un aumento de  $\geq 4$  veces en el título de anticuerpos entre los sueros agudo y convaleciente.  
<sup>c</sup> Porcentaje de perros con un título de anticuerpos positivos (título IH > 16) en el suero convaleciente.  
<sup>d</sup> Media geométrica de títulos de anticuerpos en el suero convaleciente.

5 Materiales y métodos para los ejemplos 7 -11

Tejidos caninos

10 Los exámenes post-mortem se llevaron a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Florida en 6 perros mestizos que murieron en abril/mayo de 2005 durante el brote de influenza en unas instalaciones de un refugio en el noreste de Florida, y en un perro Yorkshire terrier de compañía que murió en mayo de 2005 durante un brote de influenza en una clínica veterinaria del sureste de Florida. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se embebieron en parafina, y se tiñeron secciones de 5  $\mu$ m con hematoxilina y eosina para el diagnóstico histopatológico. Los tejidos que no se fijaron se almacenaron a -80 °C

15 pendientes de análisis virológicos.

Extracción de ARN de las muestras de tejido canino

Se descongelaron los tejidos congelados de cada uno de los 7 perros y se homogenizaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina) utilizando un molinillo de tejidos desechable (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). Se extrajo el ARN total utilizando un kit comercial (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante y se eluyó en un volumen final de 60 µl de tampón. El ARN total se extrajo también de tejido de pulmón recogido de perros sin enfermedad respiratoria.

RT-PCR en tiempo real

Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real cuantitativa en una etapa sobre el ARN total extraído de las muestras de tejido canino utilizando el kit QuantiTect® Probe RT-PCR que contenía ROX como colorante de referencia pasivo (QIAGEN Inc., Valencia, CA). En resumen, se utilizaron 2 grupos de cebador-sonda para la detección de las secuencias de influenza A en cada muestra (Tabla 7). Un grupo cebador-sonda era selectivo para secuencias genéticas de hemaglutinina (H3). El otro grupo cebador-sonda se dirigía a una región altamente conservada del gen de la matriz (M) del virus de la influenza tipo A. Para cada reacción RT-PCR en tiempo real, se añadieron 5 µl de ARN total extraído a la mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de 2X mezcla QuantiTech® Probe RT-PCR Master, 0,25 µl de mezcla QuantiTech® RT, cebadores directos e inversos (0,5 µM de concentración final de cada uno), sonda (0,1 µM de concentración final) y agua libre de RNasa con un volumen final de 25 µl. Se utilizaron los reactivos de control TaqMan® Ribosomal RNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante para la detección del ARNr 18S como control interno endógeno de la presencia de ARN extraído de las muestras de tejido canino.

Se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real cuantitativa en una etapa sobre las mezclas de reacción en un sistema Mx3000P® QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA). Las condiciones de ciclado incluían la etapa de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos, una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 15 minutos para activar la ADN polimerasa HotStarTaq®, y 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación incluía 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 al final de cada ciclo. El umbral del ciclo (Ct) se determinó fijando el umbral de fluorescencia (dR) a 1000 en cada experimento individual. Se utilizó el programa de software Mx3000P® versión 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA para la adquisición y análisis de datos. Las muestras se consideraron como positivas para el virus de la influenza A cuando el umbral de ciclo (Ct) para el gen H3 o M era 3 unidades más pequeño que el Ct para los tejidos de pulmón de perros sin enfermedad respiratoria. El control positivo consistía en la amplificación del ARN extraído del virus A/canine/FL/242/03 (H3N8)

Aislamiento del virus en células MDCK

Los tejidos de pulmón congelados de cada uno de los 7 perros se descongelaron y homogenizaron con 10 volúmenes de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 0,5% (BSA) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina). Los residuos sólidos se retiraron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas en DMEM suplementado con 1 µg/ml de tripsina tratada TPKC (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina). Las células se cultivaron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C en atmósfera humidificada y un 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se observaron diariamente para detectar cambios morfológicos y se recolectaron 5 días tras la inoculación. Los cultivos recolectados se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en células MDCK nuevas como se describió para la inoculación inicial; se llevaron a cabo dos pasajes adicionales para las muestras que no mostraron evidencia de virus de influenza por hemaglutinación o RT-PCR. La actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados se determinó utilizando glóbulos rojos de pavo al 0,5% como se ha descrito anteriormente (Burleson, F. y col., 1992; Kendal, P. y col., 1982). Se llevó a cabo la RT-PCR como se describe posteriormente.

Aislamiento del virus en embrión de pollo

Los homogenados se prepararon a partir de los tejidos de pulmón congelados como se ha descrito anteriormente para la inoculación de células MDCK. Los homogenados (0,2 ml) se inocularon en el saco alantoideo de embrión de pollo de 10 días. Después de 48 horas de incubación a 35 °C, los huevos embrionados se enfriaron a 4 °C durante una noche antes de recolectar el fluido alantoideo. Se determinó la actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes clarificados utilizando glóbulos rojos de pavo al 0,5% como se ha descrito anteriormente. Se llevaron a cabo dos pasajes adicionales en embrión de pollo para las muestras que no mostraron evidencia de virus de influenza tras la inoculación inicial.

RT-PCR, secuenciación de nucleótidos, y análisis filogenéticos

El ARN vírico se extrajo del sobrenadante de MDCK o fluido alantoideo utilizando el mini kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ARN vírico se transcribió inversamente a ADNc utilizando el kit QIAGEN® OneStep RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la amplificación PCR de la región codificante de 8 genes víricos de influenza en el ADNc como se había descrito anteriormente (Klimov, A. y col., 1992b), utilizando grupos de cebadores específicos de gen universales (secuencias del cebador disponibles bajo pedido). Las amplificaciones resultantes de ADN se utilizaron como matrices para la secuenciación automática en el secuenciador de ADN automático ABI PRISM® 3100 utilizando el ciclo de secuenciación química por terminador fluorescente (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando el Lasergene 6 Package® (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Se utilizó el programa de software PHYLIP Version 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 el análisis de unión de vecinos con el modelo de Tamura-Nei implementado en el programa MEGA© (Kumar, S. y col., 2004) y confirmado por el programa PAUP© 4.0 Beta (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA).

#### 15 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH)

Las muestras de suero se incubaron con la enzima destructora de receptor (RDE, DENKA SEIKEN Co., Ltd., Tokyo, Japón) (1 parte de suero: 3 partes de RDE) durante 16 horas a 37 °C antes de la inactivación por calor durante 30 minutos a 56 °C. El virus de la influenza A/Canine/Jacksonville/05 (H3N8) se cultivó en células MDCK durante 72 h a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se recolectaron los sobrenadantes del cultivo del virus, se clarificaron por centrifugación, y se almacenaron a -80 °C. Todos los otros virus utilizados en el ensayo de IH se cultivaron en embrión de pollo de 10 días de edad del que se recolectó el líquido alantoideo y se almacenó a -80 °C. El ensayo IH se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (Kendal, P. y col., 1982). En resumen, se añadieron 4 unidades hemaglutinantes del virus en 25 µl a un volumen igual de suero diluido seriadamente en placas de plástico de 96 pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió un volumen igual de glóbulos rojos de pavo 0,5% y se estimaron los títulos de hemaglutinación visualmente tras 30 minutos. El título de punto final se definió como la última dilución de suero que inhibía completamente la hemaglutinación.

#### 30 **Ejemplo 7 - Casos clínicos**

En abril y mayo de 2005, se produjo un brote de enfermedad respiratoria que se había descrito anteriormente (Crawford, P.C. y col., 2005) en perros alojados en unas instalaciones de un albergue en el noreste de Florida. Los brotes implicaban al menos 58 perros que variaban en edades de 3 meses a 9 años, e incluían tanto perros de pura raza como mestizos. Los signos clínicos más comunes eran descarga nasal purulenta y tos durante 7 a 21 días. De los 43 perros que tenían enfermedad clínica durante ≥ 7 días, 41 tenían títulos de anticuerpo HI contra canine/FL/04 (H3N8) con un intervalo entre 32 a > 1024. Al menos 10 perros progresaron a neumonía, de los que a 6 se les practicó una eutanasia. Estos 6 perros mestizos incluían 3 machos y 3 hembras con una variación de 4 meses a 3 años. La duración de los signos clínicos iba de 2 a 10 días cuando se practicó la eutanasia. En el examen post-mortem, estos perros tenían congestión pulmonar y edema. El examen histológico del tracto respiratorio reveló rinitis, traqueítis, bronquitis, bronquiolitis, y bronconeumonía supurativa. Había necrosis y erosión de células epiteliales de la tráquea, bronquios, bronquiolos, y glándulas bronquiales. Los tejidos respiratorios estaban infiltrados con neutrófilos y macrófagos.

En mayo de 2005, se produjo un brote de enfermedad respiratoria en 40 perros de compañía en una clínica veterinaria en el sureste de Florida. Los signos clínicos más comunes eran descarga nasal purulenta y tos durante 10 a 30 días. De los 40 perros, 17 eran seropositivos contra canine/FL/04 (H3N8) con títulos de anticuerpos HI que iban de 32 a >1024. Se produjo seroconversión en 10 perros de los que estaban disponibles sueros agudo y convaleciente. Tres perros progresaron a neumonía. Uno de estos perros, un Yorkshire terrier macho de 9 años, murió 3 días después de la aparición de los signos clínicos. Este perro tenía traqueobronquitis, edema pulmonar y congestión, y bronconeumonía grave. Al igual que los 6 perros del refugio, había necrosis celular y erosión de las vías aéreas e infiltrados neutrofilicos en los tejidos.

#### 50 **Ejemplo 8 - RT-PCR en tiempo real y aislamiento vírico**

Se analizaron los tejidos pulmonares de 7 perros por ensayos RT-PCR en tiempo real que detectaba el gen M de la influenza tipo A y el gen H3 del virus de la influenza H3N8. Los pulmones de los 7 perros eran positivos tanto al gen M de influenza A y al gen H3 de influenza (Tabla 8). Tras 3 pasajes en células MDCK, se aislaron virus de influenza A subtipo H3N8 de los pulmones de un perro que murió en el albergue tras 3 días de neumonía. Este virus se denominó A/canine/Jacksonville/05 (H3N8) (canine/Jax/05). Tras 2 pasajes en embrión de pollo, se recuperaron virus de influenza A subtipo H3N8 de los pulmones del perro de compañía que también murió tras 3 días de neumonía. El virus se denominó A/canine/Miami//05 (H3N8) (canine/Miami/05).

#### 65 **Ejemplo 9 - Análisis genéticos de los aislados de influenza A H3N8 caninos**

Los análisis de secuencia de canine/Jax/05 y canine/Miami/05 revelaron que sus genes hemaglutinina (HA) eran idénticos en un 98% a los aislados canine/FL/04, canine/TX/04, y canine/Iowa/05 recuperados de los pulmones de

los galgos Greyhounds que murieron de neumonía durante los brotes de influenza en los canódromos en 2004 y 2005 (Crawford, P.C. y col., 2005; Yoon K-Y. y col., 2005). Además, los genes HA de los virus canine/Jax/05 y canine/ Miami/05 eran idénticos en un 98% a los virus equinos de influenza contemporáneos aislados después del año 2000. Las comparaciones filogenéticas de los genes HA mostraron que los virus canine/Jax/05 y canine/Miami/05 se agrupaban con los aislados de los galgos Greyhounds canine/FL/04, canine/TX/04 y los aislados equinos contemporáneos, formando un grupo distinto que los virus equinos más antiguos aislados al principio de los 90 (Figura 4). Además los aislados canine/Jax/05, canine/Miami/05 y canine/Iowa/05 estaban más estrechamente relacionados con el canine/TX/04 que con el canine/FL/04 o canine/FL/03. Los aislados en 2005 formaban un subgrupo que parece ramificarse de los virus caninos anteriores de 2003 y 2004 con diferencias de aproximadamente 10 sitios informativos de parsimonia. Estas diferencias apoyan la hipótesis que el virus de la influenza canina se estaba transmitiendo horizontalmente de perro a perro en vez de que se reintroducía periódicamente de una fuente externa. La acumulación de mutaciones de 2003 a 2005 ilustra el proceso en desarrollo de adaptación al que el virus tiene que someterse después de transmitirse a un nuevo huésped, como se espera que tuvo que ocurrir con los virus de la influenza canina.

**Ejemplo 10 - Análisis de aminoácidos de los aislados de influenza canina A H3N8**

Había sustituciones de aminoácidos conservadas en los 6 aislados caninos que les diferenciaban de los virus contemporáneos de influenza equina (Tabla 9). Estas sustituciones conservadas eran I15M, N83S, W222L, I328T, y N483T. Las comparaciones filogenéticas de la proteína HA madura que demostraban que los virus canine/Jax/05, canine/Miami/05 y canine/Iowa/05 formaban un subgrupo con el aislado canine/FL/04 (Figura 4). Había 3 cambios de aminoácidos (L118V, K261N, y G479E) que diferenciaba este subgrupo de otros virus caninos (Tabla 9). Había dos cambios de aminoácidos (F79L y G218E) que diferenciaba los aislados de 2005 de su raíz canine/TX/04. Además, los aislados de 2005 que no eran de galgos Greyhounds, canine/Jax/05 y canine/Miami/05, se diferenciaban de los aislados de galgos Greyhounds canine/Iowa/05 por un cambio de aminoácidos, R492K. Finalmente, el canine/Jax/05 se diferenciaba de canine/Miami/05 en un único aminoácido, S107P. En todos los otros virus H3N8 caninos y equinos S se conservaba en la posición 107 excepto para A/Equine/Jilin/1/89 que tiene una T (Guo Y. y col., 1992).

**Ejemplo 11 - Análisis antigénico de aislados de influenza canina A H3N8**

Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) se llevaron a cabo utilizando un panel de antígenos de los virus de influenza equina antiguos y contemporáneos y los virus de influenza canina, y el suero recolectado en 2005 de los caballos y perros que se habían infectado con virus de influenza (Tabla 10). También se incluyó en los análisis el suero de hurones inmunizados contra canine/FL/04. Los títulos de anticuerpos HI en el suero equino eran 8 a 16 veces más altos en los virus equinos contemporáneos ensayados al compararse con los virus equinos antiguos, pero eran al menos 4 veces menores cuando se ensayaban con los virus caninos. El suero canino era no reactivo con los virus equinos antiguos, pero los títulos de anticuerpos aumentaban 4 veces cuando se ensayaban con los aislados equinos contemporáneos y aislados caninos. Esto se observaba también en el suero de hurones inmunizados contra virus de influenza canina. Estos patrones de serorreactividad demostraban la similitud antigénica entre los virus de influenza canina y los virus de influenza equina contemporáneos y eran coherentes con los análisis filogenéticos. Los títulos de anticuerpos en los sueros equino, canino y de hurón contra el aislado canine/Miami/05 eran similares a los de los aislados caninos de 2003 y 2004. Sin embargo, los títulos eran de 2 a 4 veces para el aislado canine/Jax/05. Esto sugiere que el canine/Jax/05 es distinto antigénicamente de los otros aislados caninos, que puede estar relacionado en parte con el cambio de un único aminoácido en la posición 107 de la HA madura.

**Tabla 7.** Cebadores y sondas para el análisis RT-PCR en tiempo real para el gen de la matriz del virus de la influenza A y el gen H3 de la influenza 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-aattcacagcagagggattcacatggacag-BHQI (SEC ID N° 81)	SondaTaqMan®
FluA-M-F151	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaagacc-3' (SEC ID N° 82)	Cebador directo para M
FluA-M-R276	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaakcgctca-3' (SEC ID N° 83)	Cebador inverso para M



<b>Tabla 7.</b> Cebadores y sondas para el análisis RT-PCR en tiempo real para el gen de la matriz del virus de la influenza A y el gen H3 de la influenza canina A (H3N8).			
<b>Cebador</b>	<b>Diana</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Aplicación</b>
FluA-M-P218	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgcccAgt-BHQ1 <sup>b</sup> (SEC ID N° 84)	SondaTaqMan®
<sup>a</sup> La letra r subrayada representa los nucleótidos a o g y la letra k subrayada representa los nucleótidos g o t. <sup>b</sup> Las letras mayúsculas representan restos de ácido nucleico bloqueados.			

<b>Tabla 8.</b> RT-PCR cuantitativa en tiempo real y aislamiento vírico que se llevaron a cabo en tejidos pulmonares de perros que murieron de neumonía durante los brotes de enfermedad respiratoria en un albergue y en una clínica veterinaria en Florida.					
<b>ID del perro</b>	<b>Localización</b>	<b>Duración de la enfermedad clínica</b>	<b>RT-PCR en tiempo real</b>		<b>Aislamiento del Virus</b>
			<b>M (Ct)</b>	<b>HA (Ct)</b>	
Control positivo A/canine/FL/242/03			28,15	27,36	
1079	Refugio (NE FL)	2 días	29,81	28,84	ninguno
1078	Refugio (NE FL)	3 días	30,37	29,71	3 <sup>er</sup> pasaje por MDCK
318	Refugio (NE FL)	9 días	33,89	32,97	ninguno
320	Refugio (NE FL)	10 días	39,44	37,09	ninguno
319	Refugio (NE FL)	6 días	33,87	32,23	ninguno
1080	Refugio (NE FL)	6 días	38,87	38,23	ninguno
374	Clínica veterinaria (SE FL)	3 días	24,05	22,65	2 <sup>o</sup> pasaje por huevo

Tabla 9. Comparación de aminoácidos de HA madura entre virus de influenza canina y virus de influenza equina contemporáneos.

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

<b>Tabla 10.</b> Títulos de anticuerpos en el suero equino, canino y de hurón contra virus de influenza equina antiguos y contemporáneos y virus de la influenza canina.			
<b>Antígenos</b>	<b>Títulos de anticuerpo en el suero<sup>a</sup></b>		
	<b>Equino</b>	<b>Canino</b>	<b>Hurón<sup>b</sup></b>
equine/Miami/63	40	<10	16
equine/Ky/86	40	40	32
equine/KY/92	40	<10	32
equine/NY/99	320	40	128
equine/KY/05/02	320	160	256
equine/MA/213/03	640	160	512
equine/OH/01/03	640	160	512
canine/FL/03	160	160	512
canine/FL/04	160	80	512
canine/Tx/04	160	160	512
canine/Miami/05	160	80	256
canine/Jax/05	40	40	128

<sup>a</sup> Los títulos de anticuerpos se determinaron en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación llevado a cabo con diluciones seriadas de suero equino, canino y de hurón y los virus enumerados en la columna de antígenos.

<sup>b</sup> Suero de hurones inmunizados con el virus canine/FL/04.

#### MATERIALES Y MÉTODOS DE EJEMPLO PARA LOS EJEMPLOS 12-15

##### 5 Inóculo del virus de la influenza canina

El inóculo de virus se preparó por inoculación en células epiteliales de riñón canino Madin-Darby con un canine/FL/04 (H3N8) almacenado que representaba el pasaje 3 del aislado original descrito anteriormente (Crawford y col., 2005). Las células MDCK inoculadas se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con 1 µg/ml de tripsina tratada con TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina) en matraces de 250 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se observaron diariamente para detectar cambios morfológicos y se recolectaron a los 5 días tras la inoculación. Los cultivos recolectados se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C a la espera de inocularse a perros. Se utilizó una alícuota de sobrenadante para determinar el título de virus por el método Reed y Muench. El título era 10<sup>7</sup> dosis infecciosa de cultivo tisular media (TCID<sub>50</sub>) de canine/Florida/43/2004 (canine/FL/04) por ml.

##### Inoculación experimental

Se utilizaron ocho perros de 4 meses de edad mestizos criados en la colonia (Marshall BioResources, North Rose, NY) (4 machos y 4 hembras) para un estudio de inoculación experimental aprobado por el Comité institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Florida. Los pesos corporales de los perros iban de 13 a 17 kg. Los perros estaban sanos según las exploraciones físicas, los análisis básicos de sangre, y registrando las temperaturas corporales durante 2 semanas antes de la inoculación. Todos los perros estaban libres de exposición anterior al virus de la influenza canina, según los ensayos de serología que se llevaron a cabo en muestras de suero emparejadas recogidas en el momento de llegada a las instalaciones y 2 semanas después. Los perros se anestesiaron por inyección intravenosa de propofol (Diprivan®, Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg de peso corporal hasta efecto) para la intubación con tubos endotraqueales. A seis de los perros (3 machos y 3 hembras) se les inocularon 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> de virus canine/FL/04 en 5 ml de solución salina estéril administrada en la tráquea distal por medio de un catéter de goma de pequeño calibre insertado en el tubo endotraqueal. A dos perros (1 macho y 1 hembra) se les inoculó falsamente con un volumen igual de solución salina estéril. Los perros de control inoculados falsamente se alojaron en una habitación diferente de la de los perros inoculados con el virus y fueron atendidos por personal diferente. Las exploraciones físicas y los registros de temperatura rectal se llevaron a cabo dos veces al día durante 6 días post inoculación (p.i.).

35

Recolección faríngea y rectal con torunda

Para controlar la eliminación de virus, se recolectaron especímenes orofaríngeos dos veces al día de cada perro los días 0 a 6 p.i. utilizando torundas de poliéster (Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, PA). Las torundas se colocaron en 1 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) que contenía 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA). Las torundas rectales se recolectaron de cada perro diariamente los días 0 a 6. Los extractos de las torundas se prepararon por clarificación del medio de transporte de la torunda por centrifugación. Una alícuota del extracto de la torunda se ensayó inmediatamente para detectar nucleoproteína del virus de influenza A utilizando el kit de inmunoensayo comercial Directigen™ (BD, Franklin Lakes, NJ) según las instrucciones del fabricante. El extracto restante se almacenó a -80 °C pendiente de otros ensayos virológicos.

Examen post-mortem

El día 1 p.i. se les practicó la eutanasia a un perro inoculado falsamente y a un perro inoculado con virus por medio de inyección intravenosa de solución Beuthanasia-D® (1 ml/5 kg de peso corporal; Schering-Plough Animal Health Corp). De manera similar, se practicó la eutanasia en un perro inoculado con virus cada día desde el día 2 al 5 p.i. El día 6 p.i., se les practicó la eutanasia a los restantes perros inoculados falsamente e inoculados con virus. Los exámenes post-mortem completos los llevó a cabo uno de los investigadores (WLC). Se fijaron los tejidos en formalina tamponada neutra al 10%, se embebieron en parafina, y se tñieron secciones de 5 µm bien con hematoxilina y eosina para el diagnóstico histopatológico, o bien se procesaron por inmunohistoquímica como se describe posteriormente. Los tejidos pulmonares no fijados se remitieron al Servicio de Diagnóstico Clínico Microbiológico/Parasitológico/Serológico de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida para el aislamiento e identificación bacteriana. Las muestras se cultivaron en un medio no selectivo así como un 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 informar de un crecimiento negativo. Se almacenaron tejidos sin fijar a -80 °C pendientes de análisis virológicos.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tráquea desparafinadas y rehidratadas de 5 µm se montaron en portaobjetos Bond-Rite™ (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) y posteriormente se trataron con proteinasa K (DAKO Cytomation Inc., Carpinteria, CA) seguido de reactivo bloqueante de peroxidasa (DAKO® EnVision™ Peroxidase Kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA). Las secciones se incubaron con una dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal contra influenza A H3 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los controles incluían la incubación de las mismas secciones con IgG de ratón (1 mg/ml, Serotec, Inc. Raleigh, NC), y la incubación de anticuerpo monoclonal con secciones de pulmón canino normales. Después del tratamiento con el anticuerpo primario, se incubaron las secciones con la inmunoperoxidasa secundaria y los reactivos de sustrato de peroxidasa (Dako® EnVision™ Peroxidase Kit, Dako Corp.) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se contrañieron con hematoxilina, se trataron con el clarificante nº 2 y el reactivo Bluing (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), se deshidrataron, y se aplicaron los cubreobjetos con Permout (ProSciTech, Queensland, Australia).

Extracción de ARN de las torundas y tejidos

Los tejidos de pulmón y traqueal de cada perro se descongelaron y homogenizaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) y antibióticos (gentamicina y ciprofloxacina) utilizando un molino tisular desechable (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). Se extrajo el ARN total de los homogenizados de tejido así como de los extractos de torundas orofaríngea y rectal utilizando un kit comercial (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante y se eluyó hasta un volumen final de 60 µl en tampón.

RT-PCR en tiempo real

Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real cuantitativa sobre el ARN total utilizando el QuantiTect® Probe RTPCR Kit que contenía ROX como colorante de referencia pasivo (QIAGEN Inc., Valencia, CA) y un primer grupo cebador-sonda que se dirigía a una región altamente conservada del gen de la matriz (M) del virus de la influenza tipo A (Payungporn S. y col., 2006a; Payungporn S. y col., 2006b). Para cada reacción de RT-PCR en tiempo real se añadieron 5 µl del ARN total extraído a la mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de 2X QuantiTect® Probe RT-PCR Master Mix, 0,25 µl of QuantiTect® RT Mix, cebadores directo e inverso (0,4 µM de concentración final de cada uno), sonda (0,1 µM de concentración final) y agua libre de RNasa en un volumen final de 25 µl. Se utilizaron reactivos de control TaqMan® GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante para la detección de GAPDH como control interno endógeno de la presencia de ARN extraído de las muestras de torundas y de tejido y como control de normalización.

La RT-PCR en tiempo real cuantitativa en una etapa se llevó a cabo sobre las mezclas de reacción en un Mx3000P® QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA). Las condiciones cíclicas incluía una etapa de transcripción inversa a 50 °C

durante 30 minutos, una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 15 minutos para activar la ADN polimerasa HotStarTaq®, y la amplificación con 50 ciclos. Cada ciclo de amplificación incluía la desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos seguido por hibridación/extensión a 60 °C durante 1 minuto. Las señales del umbral de fluorescencia 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 umbral de ciclo (Ct) se determinó fijando el umbral de fluorescencia (dR) en 1000 en cada experimento individual. Se utilizó el programa de software Mx3000P® versión 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA) para la adquisición y análisis de los datos. Los controles positivos consistieron en la amplificación del ARN extraído del virus canine/FL/04 (H3N8). Los resultados se normalizaron dividiendo el valor Ct de M por el correspondiente valor Ct de GAPDH para cada muestra.

#### 10 Re-aislamiento del virus en los tejidos

Se descongelaron los tejidos congelados de pulmón y tráquea de los perros inoculados con el virus y se homogenizaron en 10 volúmenes de DMEM suplementado con 0,5% de BSA y antibióticos. Los restos sólidos se retiraron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon a células MDCK cultivadas en DMEM suplementado con 1 µg/ml de tripsina tratada con TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y antibióticos como se ha descrito anteriormente. Se cultivaron las células en matraces de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se observaron diariamente para detectar cambios morfológicos y se recolectaron a los 5 días post inoculación. Los cultivos recolectados se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se inocularon en células MDCK nuevas como se ha descrito para la inoculación inicial; se llevaron a cabo dos pasajes adicionales para las muestras que no mostraron evidencia de virus de influenza por hemaglutinación o RT-PCR. Se determinó la actividad de hemaglutinación en los sobrenadantes utilizando un 0,5% de glóbulos rojos de pavo como se había descrito anteriormente (Crawford y col., 2005). Se llevó a cabo la RT-PCR como se describe posteriormente.

#### 25 RT-PCR, secuenciación de nucleótidos, y análisis filogenético

Se extrajo el ARN vírico del sobrenadante de MDCK utilizando QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ARN vírico se transcribió inversamente a ADNc utilizando el OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la amplificación PCR de la región codificante de 8 genes de influenza vírica en el ADNc como se había descrito anteriormente (Crawford y col., 2005), utilizando el grupo de cebadores específico del gen universal (secuencias del cebador disponible bajo pedido). Las amplificaciones de ADN resultantes se utilizaron como matriz para la secuenciación automática en el secuenciador automático de ADN ABI PRISM® 3100 utilizando ciclos de secuenciación química por terminador fluorescente (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de nucleótidos para los virus recuperados de perros infectados se compararon con las secuencias del virus en el inóculo para determinar cualquier cambio que hubiera ocurrido en el tracto respiratorio.

#### **Ejemplo 12 - Enfermedad clínica**

40 Los 6 perros inoculados con el virus desarrollaron una fiebre transitoria (temperatura rectal ≥ 39 °C) durante los 2 primeros días p.i., pero no mostraron signos respiratorios tales como tos o descarga nasal durante los 6 días del periodo de observación. Los perros inoculados falsamente permanecieron clínicamente sanos.

#### **Ejemplo 13 - Eliminación de virus**

45 Se detectó nucleoproteína de influenza A en las torundas orofaríngeas recolectadas de uno o más perros inoculados con el virus a las 24 horas p.i. Las torundas orofaríngeas recolectadas de un perro a las 72, 84 y 120 horas p.i. y otro perro a las 108, 120, y 132 horas p.i., fueron positivas a los virus por RT-PCR en tiempo real (Tabla 11). El número absoluto de copias del gen M de influenza por µl de extracto de torunda aumentó en un periodo de tiempo de 3 a 6 días p.i. No se detectaron virus en las torundas rectales.

#### **Ejemplo 14 - Exámenes post-mortem**

55 Al contrario que con la infección experimental previa utilizando Beagles libres de patógenos específicos (Crawford y col., 2005), los perros mestizos inoculados con el virus tuvieron neumonía como se evidenció por los análisis macroscópicos e histológicos de los pulmones de los días 1 a 6 p.i. Además de neumonía, los perros tenían rinitis, traqueítis, bronquitis, y bronquiolitis similares a las descritas en los perros infectados naturalmente (Crawford y col., 2005). Había necrosis epitelial y erosión del revestimiento de las vías aéreas y glándulas bronquiales con infiltración de neutrófilos y macrófagos en los tejidos submucosos (Figura 5, paneles superiores). La inmunohistoquímica detectó el antígeno 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 dos perros inoculados falsamente eran normales.

#### **Ejemplo 15 - Replicación del virus en tráquea y pulmones**

5 La tráquea y los pulmones fueron positivos a los virus por RT-PCR en tiempo real en todos los perros desde el día 1 al 6 p.i. (Tabla 12). El número absoluto de copias del gen M de la influenza por  $\mu\text{l}$  de homogenado de tráquea aumentaba del día 1 al 5 p.i., y luego descendía el día 6. El número absoluto de copias del gen M por  $\mu\text{l}$  de homogenado de pulmón disminuía del día 1 al día 6 días p.i. En general, la tráquea contenía  $\geq$  un  $\log_{10}$  más virus que el pulmón en cada uno de los 6 días p.i.

**Tabla 11.** Detección de eliminación del virus en la orofaringe de perros mestizos inoculados con virus de la influenza canina por RT-PCR en tiempo real cuantitativa.

ID del perro	Tiempo p.i. (horas) <sup>a</sup>	Relación M/GAPDH <sup>b</sup>	Gen de la matriz (copias / $\mu\text{l}$ ) <sup>c</sup>
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

<sup>a</sup> Tiempo al que se recolectaron las torundas orofaríngeas de los perros tras la inoculación con el virus A/canine/FL/43/04 (H3N8).  
<sup>b</sup> Relaciones de normalización que se calcularon dividiendo el (Ct) M por el (Ct) GAPDH para cada extracto de torunda.  
<sup>c</sup> Número absoluto de copias del gen de la matriz por  $\mu\text{l}$  de extracto de torunda.

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

ID del perro	Tiempo p.i. (horas) <sup>a</sup>	Relación M/GAPDH <sup>b</sup>		Gen de la Matriz (copias / $\mu\text{l}$ ) <sup>c</sup>	
		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

<sup>a</sup> Tiempo en que se recolectaron los tejidos de los perros después de la inoculación con virus A/canine/FL/43/04 (H3N8).  
<sup>b</sup> Relaciones de normalización que se calcularon dividiendo (Ct) M por el (Ct) GAPDH para cada homogenado de tejidos.  
<sup>c</sup> Número absoluto de copias del gen de la matriz por  $\mu\text{l}$  de homogenado de tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS DE EJEMPLO PARA EL EJEMPLO 16

10

Cepas víricas

15 Las cepas del virus de la influenza así como las de origen aviar, equino y humano (enumeradas en la Tabla 15) se propagaron en embrión de pollo o en células MDCK y su infectividad se tituló por dilución de punto final en embriones de pollo, o ensayo en placas. La cuantificación rápida de virus se llevó a cabo por el ensayo de hemaglutinación utilizando glóbulos rojos de pavo.

Especímenes diagnósticos

20 Se ensayaron un total de 60 tejidos pulmonares caninos recolectados de casos sospechosos de enfermedad respiratoria vírica durante el año 2005 para detectar la presencia de virus canino de la influenza.

Extracción de ARN de las muestras de tejido canino

Los bloques de tejido pulmonar que pesaban entre 20 y 30 mg se homogenizaron en un molinillo de tejidos desechable (Kendal). Se extrajo el total de ARN utilizando un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y se eluyeron en un volumen final de 60  $\mu$ l, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5

#### Diseño de cebadores y sondas

Se llevaron a cabo múltiples alineamientos de secuencia de los genes H3 y M de varios subtipos y de diversas especies utilizando el programa CLUSTAL X (Versión 1.8). Los cebadores de la matriz (M) y las sondas se seleccionaron de las regiones conservadas de las secuencias conocidas correspondientes con diferentes subtipos del virus de la influenza A, mientras que el grupo de cebadores y sondas específicos del gen de hemaglutinina H3 se seleccionaron para coincidir específicamente con los genes del virus de influenza A canina y equina y no coincidir con los genes homólogos aviares y humanos (Tabla 13). Se utilizaron el software de diseño de cebadores (OLIGOS Versión 9.1) y las herramientas de análisis basadas en la red proporcionadas por EXIQON (<http://lnatools.com>) para calcular la  $T_m$  y predecir la estructura secundaria así como la autohibridación. Se utilizó una región conservada de un gen ARNr 18S como control interno endógeno para la presencia de ARN extraído de la muestra de tejido canino. Se utilizaron los reactivos de ensayo para ARNr 18S de eucariotas Pre-desarrollado TaqMan® (VIC/TAMRA) (Applied Biosystems) para la detección en tiempo real de ARNr 18S en las muestras de tejido.

10

15

#### Condiciones de RT-PCR en tiempo real

Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real de una etapa utilizando el kit Quantitect Probe RT-PCR que contenía ROX como colorante de referencia pasiva (Qiagen, Valencia, CA). En cada reacción de RT-PCR en tiempo real, se usaron 5  $\mu$ m de ARN de la muestra como matriz para combinarlos con la mezcla de reacción que contenía 10  $\mu$ l de 2X QuantiTech Probe RT-PCR Master Mix, 0,2 ml de QuantiTech RT Mix, cebadores (0,4  $\mu$ M conc. final para el gen H3 o 0,6  $\mu$ M de conc. final para el gen M), sonda (0,1  $\mu$ M conc. final para el gen H3 o 0,2  $\mu$ M conc. final para el gen M) y agua libre de RNasa en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real en el sistema Mx3005P Real-Time QPCR (Stratagene). Las condiciones de ciclado incluyen una etapa de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos. Tras una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 15 minutos con el fin de activar la ADN polimerasa HotStarTaq, se llevó a cabo la amplificación durante 40 ciclos incluyendo una desnaturalización (94 °C durante 15 segundos) y una hibridación / extensión (60 °C durante 30 segundos). Las señales de fluorescencia de FAM (longitud de onda de emisión 516 nm para la detección de H3 y M) y VIC (longitud de onda de emisión 555 nm para la detección de ARNr 18S) se obtuvieron una vez por ciclo al final de la etapa de extensión. La adquisición y análisis de datos del ensayo de PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando el software Mx3005P versión 2.02 (Stratagene).

25

30

35

#### Especificidad del grupo cebadores/sonda para H3 para la influenza canina (H3N8) y la universalidad del grupo de cebadores/sonda de M para el virus de la influenza tipo A

Con el fin de ensayar la especificidad de cada grupo cebadores/sonda, se utilizó el ARN extraído de varios subtipos conocidos de virus de influenza A como matriz en el ensayo RT-PCR en tiempo real (Tabla 15).

40

#### ARN de referencia para la determinación de la actuación de la RT-PCR en tiempo real

Los genes del virus de la influenza canina A (A/canine/Florida/242/2003(H3N8)) se utilizaron para generar las amplificaciones PCR para H3 (nt 1-487) y M (nt 1-276) utilizando cebadores unidos con el promotor T7 (Tabla 13). Luego, las amplificaciones PCR de los genes H3 y M se utilizaron como matrices para la transcripción *in vitro* utilizando el sistema-T7 de transcripción *in vitro* 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 entonces en series de 10 veces, variando de  $10^8$  a 10 copias/  $\mu$ l para realizar los ensayos de sensibilidad. Además, se generó una curva de referencia trazando el log de las concentraciones iniciales de la matriz ARN (copias/  $\mu$ l) contra el umbral de ciclo (Ct) obtenido de cada dilución con el fin de determinar la actuación total de la RT-PCR en tiempo real.

45

50

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

Se utilizaron virus almacenados de dos cepas víricas que incluían A/Wyoming/3/2003 (H3N2) a  $10^{6,67}$  EID<sub>50</sub>/ml (HA=64) y A/canine/Florida/242/2003(H3N8) a  $10^{7,17}$  EID<sub>50</sub>/ml (HA=16) para el ensayo del umbral de detección. Se utilizaron diluciones logarítmicas de especímenes en solución salina tamponada de fosfato (PBS) (125  $\mu$ l) en un kit rápido de detección de antígeno de influenza A, Directigen Flu A, (Becton, Dickinson and Company) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada dispositivo de test Directigen Flu A, tiene una mancha de influenza H1N1 en el centro de la membrana que desarrolla un punto púrpura e indica la integridad del ensayo, que se basa en un anticuerpo contra la nucleoproteína (NP). El desarrollo de un triángulo púrpura alrededor del punto indica la presencia de NP en el espécimen ensayado. La intensidad de la señal púrpura del triángulo se valora como + (encuadra el triángulo), ++ (triángulo ligeramente coloreado), +++ (triángulo púrpura oscuro) y ++++ (triángulo

60

65

púrpura muy oscuro). Se extrajo el ARN vírico de alícuotas de 125  $\mu$ l de cada dilución de virus utilizando el mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Valencia, CA) y se eluyeron en un volumen final de 50  $\mu$ l. Se ensayó un volumen de 5  $\mu$ l de los ARN del extracto vírico por RT-PCR en tiempo real para el ensayo comparativo de sensibilidad con el kit Directigen Flu A.

5

### Ejemplo 16

El ensayo RT-PCR en tiempo real para la influenza canina se basa en la información de tres sondas moleculares que se dirigen al ARNr de la célula huésped así como a M y H3 del genoma del virus de la influenza A (Tabla 14). La amplificación del gen huésped es un reflejo de la calidad y la integridad del espécimen. Se espera que las muestras clínicas, de necropsia o de laboratorio que contienen virus de influenza (H3N8) den lugar a una señal de amplificación con las tres sondas. Los especímenes que dan lugar a una señal de amplificación con sondas de M y de ARNr 18S pero negativas a H3 serían indicativas de un virus de influenza subtipo H3 de origen humano, porcino o aviar o de subtipos no H3. Estos raros casos se podrían resolver por RT-PCR utilizando cebadores universales HA para generar una amplificación ADNc que se pueda analizar por secuenciación. Los especímenes recolectados y manejados apropiadamente que carecen de virus de influenza A dan lugar a amplificación de señal de ARNr 18S solamente. Las situaciones en las que solo la sonda ARNr 18S y las sondas H3 dan lugar a señal de amplificación indican una técnica equivocada, a menos que se pruebe otra cosa; se tiene que demostrar o bien un falso negativo con sondas M o falso positivo para H3. Finalmente, los especímenes que no dan lugar a señales de amplificación con las tres sondas son indicativos de recolección deficiente, degradación, falta de extracción de ARN o la presencia de inhibidores de las polimerasas utilizadas en la PCR.

Con el fin de ensayar la especificidad del grupo de cebadores/sonda H3 para el virus de la influenza canina A (H3N8) y la universalidad del grupo de cebadores /sonda M para la influenza tipo A, se ensayaron varios subtipos de virus de influenza tipo A por RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran que el grupo de cebadores/sonda H3 daban lugar a solamente señal de amplificación positiva con influenza canina (H3N8). No se observaron falsos positivos significativos ni señales de amplificación no específicas en otros subtipos o cepas H3 humanas. El grupo cebadores/sonda M daba lugar a señal de amplificación positiva con todas las cepas ensayadas (Tabla 15). Estos resultados indicaban que los cebadores/sonda H3 detectan específicamente el virus de la influenza A canina (H3N8) mientras que los cebadores/sonda M detectan múltiples subtipos de virus de influenza A.

Se evaluó la actuación de los ensayos RT-PCR por dilución de punto final de los ARN transcritos *in vitro* M y H3. Como se esperaba, el umbral del ciclo (Ct) aumentaba en relación directa con la dilución de los ARN de referencia. Las señales fluorescentes se pueden detectar en las diluciones de ARN de referencia de M y H3 tan bajas como de  $10^3$  y  $10^2$  copias/  $\mu$ l, respectivamente (Figura 6 A y 6B). Las curvas de referencia de los genes M y H3 se construyeron representando el log de las concentraciones de ARN de entrada contra el umbral de ciclo (Ct) obtenido de cada dilución (Figura 6C y 6D). La pendiente de la curva de referencia se utiliza para determinar la eficacia de la reacción PCR, lo que es teóricamente exponencial; el 100% de eficacia de amplificación implicaría doblar la concentración de la amplificación cada ciclo. Las curvas de referencia con una pendiente entre aproximadamente -3,1 y -3,6 son aceptables típicamente para la mayoría de las aplicaciones que necesitan una cuantificación precisa (90-110% de eficacia de la reacción). Un valor Rsq es el ajuste de todos los datos al gráfico de la curva de referencia. Si todos los datos están perfectamente en la línea, el Rsq será de 1,00. Según los datos caen lejos de la línea, el Rsq desciende. Un valor  $Rsq \geq 0,985$  es aceptable para la mayoría de los ensayos. La curva de referencia M revelaba una pendiente de -3,576 (eficacia = 90,4% y  $Rsq = 1,00$  mientras que la curva de referencia H3 da lugar a una pendiente de -3,423 (eficacia = 95,9%) y  $Rsq = 0,999$ . Estos valores indican una eficacia de amplificación y actuación total de la RT-PCR en tiempo real satisfactorias. Los inventores atribuyen la disminución de eficacia y sensibilidad del grupo de los cebadores/sonda M al compararse con el grupo de cebadores/sonda H3 a la degeneración de N veces de las secuencias del cebador M que se necesitan para asegurar una amplia cobertura de la variabilidad de las secuencias del gen M a través de los virus de múltiples subtipos, huéspedes y linajes.

La sensibilidad del ensayo RT-PCR en tiempo real se comparó también con el ensayo de detección de antígeno rápido comercial (Directigen Flu A). Las diluciones logarítmicas de A/Wyoming/3/2003 (H3N2) y A/canine/Florida/242/2003(H3N8) se analizaron con Directigen Flu A y por RT-PCR en tiempo real. Los resultados de Directigen Flu A mostraban que las sensibilidades contra ambas cepas víricas aproximadamente estaban en diluciones de 100 veces la de los virus almacenados utilizados en estos experimentos (Figura 7). Las señales (de color púrpura) generadas por las muestras de virus canino (A/canine/Florida/242/2003:  $10^6$  x UFP/ml) eran mucho más débiles que las encontradas en el virus humano (A/Wyoming/3/2003:  $10^{7,x}$  UFP /ml), de acuerdo con la menor concentración de virus en estas muestras. De manera alternativa, la señal más baja de la influenza canina podría atribuirse a la especificidad molecular de los anticuerpos monoclonales contra la NP; es decir, pobre conservación de los aminoácidos en el epítipo NP de virus de influenza canina A.

La RT-PCR en tiempo real del gen M daba lugar a valores Ct por encima del umbral con los virus 10 y 30 equivalentes UFP por reacción de A/canine/Florida/242/2003 y A/Wyoming/3/2003, respectivamente (Tabla 16). Las diferencias entre el valor de la sensibilidad de dos cepas víricas son debidas a diferencias en los títulos víricos originales. La comparación de detección del gen H3 entre los virus de influenza humana y canina no se realizó

65



debido a que los cebadores/sonda H3 en el ensayo RT-PCR amplifican exclusivamente el virus de la influenza A canina. La RT-PCR era 10<sup>5</sup> veces más sensible que el kit de detección de antígeno rápido.

5 Para evaluar la actuación del ensayo RT-PCR en los especímenes de necropsia de perros con enfermedad respiratoria aguda, sesenta muestras de tejido pulmonar canino remitidas durante el año 2005 se ensayaron para detectar la presencia de virus de influenza canina A por RT-PCR en tiempo real. Un total de 12 de las 60 muestras (20%) eran positivas para ambos genes M y H3 mientras que las restantes 48 muestras daban lugar a un resultado negativo para ambos genes M y H3. Los intentos de aislamiento se llevaron a cabo por inoculación en embrión de pollo y en células MDCK, para evaluar la especificidad del ensayo en tiempo real; 2 de las 12 muestras que fueron 10 positivas para influenza canina por RT-PCR dieron lugar a virus de influenza canina (datos no mostrados, manuscrito en preparación). Aunque todos los tejidos se recolectaron de perros con una historia de enfermedad respiratoria grave, la mayoría de las muestras no daban lugar a virus de la influenza canina por PCR en tiempo real o por aislamiento convencional, sugiriendo una alta incidencia de otros patógenos respiratorios tales como *Bordetella bronchiseptica*, moquillo canino o virus de la parainfluenza. El ensayo RT-PCR en tiempo real en una 15 etapa del presente documento proporciona una estrategia rápida, sensible y barata para la detección del virus de la influenza canina A (H3N8). El diagnóstico de laboratorio rápido de infecciones por virus de influenza canina A (H3N8) en un estado precoz de la enfermedad puede dar información relevante del paciente clínico y el manejo en las instalaciones.

20

**Tabla 13:** Cebadores y sondas que se utilizan para la detección por 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 directo	H3 (nt 487-467)	5'-gctccactctctccgtttga-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 directo	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaakcgtcta-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'-tattcgtctcaggagcaaaagcagggg-3' (SEC ID N° 85)	Transcripción <i>In vitro</i>
T7/H3-R490	Cebador directo	T7 / H3 (nt 487-467)	5'-tgtaatacgcactcactatagggctccactctctccgtttga-3' (SEC ID N° 86)	
M-F1	Cebador directo	M (nt 1-15)	5'-gatcgcctctcaggagcaaaagcaggtag-3' (SEC ID N° 87)	Transcripción <i>In vitro</i>
T7/M-R276	Cebador directo	M (nt 276-253)	5'-tgtaatacgcactcactatagggcattttggacaaagcgtc-3' (SEC ID N° 88)	

\* Nota: Celdas superiores = LNA (Ácido nucleico bloqueado) restos, r = a o g, k = g o t, subrayado = secuencia de promotor T7

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

Interpretación	Resultados		
	M	H3	ARNr18S
Positivo al virus influenza A (H3N8) canina	+	+	+

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

Interpretación	Resultados		
	M	H3	ARNr18S
Positivo al virus influenza A (subtipo desconocido)	+	-	+
Negativo al virus influenza A	-	-	+
Error en la extracción de ARN o presencia de inhibidor en PCR	-	-	-

**Tabla 15:** Ensayo de especificidad del grupo de cebadores/sonda H3 canino y universalidad del grupo de cebadores/sonda M con varios subtipos de virus de la influenza A

Subtipos	Nombre de la cepa	Huésped	Detección RT-PCR en tiempo real	
			gen H3 (Ct)	gen M (Ct)
H1	A/Ohio/1983	Humano	No Ct	15,40
	A/WSN/1933	Humano	No Ct	20,09
H3	A/Wyoming/3/2003	Humano	No Ct	28,85
	A/Victoria/3/1975	Humano	No Ct	16,62
	A/Canino/FL/242/2003	Canino	28,43	29,25
H4	Turkey/MN/1066/1980	Aviar	No Ct	17,49
	Muestra clínica*	Aviar	No Ct	20,87
H5	A/Chicken/Thailand/CUK2/2004	Aviar	No Ct	20,13
	A/Pheasant/NJ/1335/1998	Aviar	No Ct	16,64
H6	Muestra clínica*	Aviar	No Ct	19,52
H10	Muestra clínica*	Aviar	No Ct	25,64
	Muestra clínica*	Aviar	No Ct	19,59
H11	Muestra clínica*	Aviar	No Ct	15,72
	Muestra clínica*	Aviar	No Ct	24,55

\* Nótese que los subtipos de las muestras clínicas se confirmaron por secuenciación de nucleótidos.

**Tabla 16:** Ensayo comparativo de sensibilidad para el virus de la influenza A de detección entre RT-PCR en tiempo real y Directigen Flu A

Diluciones del virus	Directigen Flu A		RT-PCR en tiempo real de M (Ct)	
	A/canine/242/03	A/Wyoming/3/03	A/canine/242/03	A/Wyoming/3/2003
10 <sup>-1</sup>	++	++++	22,42	19,48
10 <sup>-2</sup>	+	+++	25,85	22,66
10 <sup>-3</sup>	-	-	29,27	25,76
10 <sup>-4</sup>	No se hizo	No se hizo	32,66	28,66
10 <sup>-5</sup>	No se hizo	No se hizo	35,48	33,14
10 <sup>-6</sup>	No se hizo	No se hizo	37,51	35,06
10 <sup>-1</sup>	No se hizo	No se hizo	39,09	36,44

**Tabla 16:** Ensayo comparativo de sensibilidad para el virus de la influenza A de detección entre RT-PCR en tiempo real y Directigen Flu A

Diluciones del virus	Directigen Flu A		RT-PCR en tiempo real de M (Ct)	
	A/canine/242/03	A/Wyoming/3/03	A/canine/242/03	A/Wyoming/3/2003
10 <sup>-8</sup>	No se hizo	No se hizo	No Ct	38,93

**Tabla 17.**

Clase de Aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Sin carga Polar	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

5

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

Posición	Consenso Equina *	Canine/FL/03	Canine/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

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

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

Posición	Consenso Equina *	Canine/FL/03	Canine/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 del virus H3N8 de influenza equina y canina

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

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

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

Posición	Consenso Equina *	Canine/FL/03	Canine/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 H3N8 de influenza equina y canina

Posición	Consenso Equina *	Canine/FL/03	Canine/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 H3N8 de influenza equina y canina

Posición	Consenso Equina *	Canine/FL/03	Canine/FL/04
M1 161	S	S	A
M1 208	K/Q	R	R

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

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

Posición	Consenso Equina *	Canine/FL/03	Canine/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 los genes de virus disponibles aislados entre 1963 y 1998.

5

**Ejemplo 17- Desarrollo del modelo de desafío a la influenza canina**

Se observó que el virus de la influenza canina (gripe canina), que se aisló de los brotes de gripe en Florida, era un virus de influenza tipo H3N8, y estrechamente relacionado con la cepa del virus de la gripe equina A/equine/Ohio/03

(Crawford y col., SCIENCE Vol. 309, septiembre de 2005, incorporado por referencia en su totalidad en la presente patente). El potencial del uso del virus de la gripe equina A/equine/Ohio/03 para inducir una enfermedad similar a la influenza en los perros se investigó en este estudio.

5 Procedimiento:

Se obtuvieron diez beagles de 13 semanas de edad con sexos mezclados de un suministrador comercial, y se alojaron en jaulas individuales en unas instalaciones BSL-2. Los perros se asignaron aleatoriamente en dos grupos de 5 perros cada uno. Como se muestra en la Tabla 26, un grupo se sometió a desafío intratraqueal, y el otro grupo a desafío oronasal. Los perros se desafiaron a las 14 semanas de edad.

Grupo	Número de Perros	Vía del desafío
1	5	Intratraqueal
2	5	Oronasal

15 Se utilizó un virus de gripe equina A/equine/Ohio/03 cultivado en cultivos celulares como virus de desafío. Para el desafío intratraqueal, el virus de desafío se administró por un tubo de suministro, que consistía en un tubo traqueal con manguito (de tamaño 4,0/4,5, Sheridan, EE. UU.) y un tubo de alimentación (tamaño 5 Fr., 1,7 mm/ 41 centímetros de longitud, Kendall, EE. UU.) en un volumen de 0,5 a 1,0 ml. Para el desafío Oronasal, el virus de desafío ( $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub> por perro) se administró en forma de rocío utilizando un nebulizador (nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, EE. UU.) en un volumen de 2 a 3 ml.

Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con gripe durante 14 días tras el desafío y se determinó el título de HI utilizando el virus de influenza equina H3N8 con un protocolo de referencia (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Se les practicó a todos los perros la eutanasia humanitariamente y se recolectaron los tejidos pulmonares en formalina tamponada al 10% para la evaluación histopatológica.

Resultados:

Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 27. Los signos clínicos relacionados con influenza se observaron en unos cuantos perros tras el desafío. Estos signos incluían fiebre ( $> 103$  °F;  $> 39$  °C) y tos. Dos de 5 perros (es decir, el 40%) tenían fiebre ( $> 103$  °F;  $> 39$  °C) en el Grupo 1, en comparación con 1 de 5 (es decir, el 20%) perros en el Grupo 2. Un perro del grupo del desafío Oronasal había estornudado, y otro tenía tos después del desafío. Se observó un intervalo de títulos de HI de 10 a 80, con una media geométrica del título (GMT) de 20 en el Grupo 1. Se observó un intervalo de título de 40 a 160, con un GMT de 86 en el Grupo 2. Un perro de cada grupo tenía lesiones histopatológicas compatibles con o patognómicas de influenza.

**Tabla 27.** Desafío de gripe canina—signos clínicos, aislamiento vírico, resultados histopatológicos y resultados serológicos

ID del Perro*	Método de desafío*	Signos clínicos	Aislamiento vírico			Lesión microscópica (histopatología)	Serología (título HI)		
			Torunda Nasal/oral	Raspado Traqueal	Tejidos pulmonares		Pre- desafío	7-días tras desafío	14- días tras de desafío
AAH	Intra traqueal	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo	10	10	20
ADB	Intra traqueal	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	20
ADC	Intra traqueal	Fiebre*	negativo	negativo	negativo	negativo	10	20	20
AEB	Intra traqueal	Fiebre	negativo	negativo	negativo	positivo	10	40	20
AEE	Intra traqueal	ninguno	negativo	negativo	negativo	no concluyente	10	20	10
AAE	Oronasal	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	80
AAG	Oronasal	ninguno	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	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	160

\* Los animales se desafiaron con un aislado de gripe equina Ohio 03.  
 \*\* Temperatura rectal  $\geq 103$  °F;  $\geq 39,5$  °C

**Ejemplo 18 - Eficacia de una vacuna de virus de influenza equina para los perros**

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

Procedimiento:

- 10 Se obtuvieron nueve beagles de 7 semanas de edad de sexos mezclados en un suministrador comercial, y se alojaron en jaulas individuales en instalaciones BSL-2. Estos perros se asignaron aleatoriamente en dos grupos, como se resume en la Tabla 28:

Grupo	Número de Perros	Tratamiento
1	5	Vacuna
2	4	Control

- 15 El primer grupo consistía en 5 perros, que habían sido vacunados con una vacuna inactivada del virus de gripe equina A/equine/Ohio/03, adyuvada con CARBIGEN™ a las 8 y a las 12 semanas de edad por vía subcutánea (SC). El A/equine/Ohio/03 se inactivó con etilenimina binaria ("BEI") utilizando un método de referencia. Cada dosis de la vacuna contenía un 5% por masa de CARBIGEN™, 4096 unidades de HA del virus inactivado, suficiente PBS para dar un volumen total de la dosis de 1 ml, y suficiente NaOH para ajustar el pH entre 7,2 y 7,4. Se recolectaron muestras de suero de todos los perros el día de la primera y segunda vacunaciones y el día 7 y 14 tras la primera y tras la segunda vacunación, y en el pre-desafío, para determinar el título de HI utilizando un virus H3N8 de la influenza equina por el protocolo de referencia (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). A las 3 semanas tras la segunda vacunación, los 5 perros vacunados y el segundo grupo (es decir, el grupo control) que consistía en 4 perros de edad coincidente se desafiaron por vía oronasal con un virus A/equine/Ohio/03 de la influenza equina ( $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub> por perro) en un volumen de 1-2 ml por dosis. El virus de desafío se administró a los perros en forma de rocío utilizando un nebulizador (nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, EE. UU.). Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con la gripe durante 14 días tras el desafío. Se les practicó la eutanasia humanitariamente a cinco perros (3 vacunados y 2 controles) a los 7 días tras el desafío y a 4 perros (2 controles y 2 vacunados) 14 días tras el desafío para la recolección de tejidos pulmonares en formalina al 10% para su evaluación histopatológica.

Resultados:

Los resultados de este experimento están resumidos en las Tablas 29 y 30. Todos los perros vacunados mostraban seroconversión después de la vacunación. Se observó un intervalo de resultados de títulos HI de 40 a 640, con un GMT de 129, durante el periodo post-vacunación con virus A/equine/Ohio/03 de influenza equina, y se observó un título de HI de 160 a 320, con una media geométrica del título de 211, con el aislado de gripe canina A/canine/Florida/242/03. Dos de 6 vacunados tuvieron fiebre >103°F (>39,4°C) durante un día y no se observó ningún otro signo clínico en ninguno de los perros después del desafío.

Conclusión:

Todos los perros vacunados respondieron a la vacuna inactivada de influenza equina, adyuvada con CARBIGEN™. Los resultados de los títulos HI con un virus aislado de influenza canina sugieren que la vacuna inactivada de influenza equina inducía un nivel detectable de anticuerpos de reacción cruzada contra el virus de la influenza canina. Incluso aunque se utilizó el virus de desafío en estos no indujo enfermedad clínica aparente en los perros beagle, basándose en el título HI con un aislado de virus de influenza canina, se concluyó que la vacuna inactivada equina podía utilizarse en perros para inducir anticuerpos de reacción cruzada, que podían proteger potencialmente a los perros contra la enfermedad de "gripe canina" producida por virus tipo H3N8 de la influenza canina.

Perro*	Grupo	Títulos HI							
		Pre-vacunación	Post-1ª vacunación		Post-2ª vacunación			Post-desafío*	
			7-d	14-d	7-d	14-d	21-d	7-d	14-d
AKT	Vacunado**	< 10	40	80	640	640	640	320	320



Perro*	Grupo	Títulos HI							
		Pre-vacunación	Post-1 <sup>a</sup> vacunación		Post-2 <sup>a</sup> vacunación			Post-desafío*	
			7-d	14-d	7-d	14-d	21-d	7-d	14-d
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	***
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 desafiaron con un aislado Ohio 03 de gripe equina  
\*\* Se utilizó para la vacunación una vacuna inactivada del virus Ohio 03 de gripe equina adyuvada con CARBIGEN™  
\*\*\* Se practicó la eutanasia 7-días post-desafío

ID del perro	Grupo de Tratamiento	Signos Clínicos	Aislamiento del Virus			Lesión microscópica (histopatología)
			Torunda Nasal	Raspado Traqueal	Tejidos pulmonares	
AKT	Vacunado**	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
ALH	Vacunado**	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
ALU	Vacunado**	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
ANJ	Vacunado**	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
ANU	Vacunado**	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
AJW	Control	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
AKR	Control	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
ALZ	Control	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo
ARC	Control	ninguno	negativo	negativo	negativo	negativo

\* Los animales se desafiaron con un aislado Ohio 03 de gripe equina  
\*\* Se utilizó para la vacunación vacuna inactivada del virus Ohio 03 de gripe equina y adyuvada con CARBIGEN™

### Ejemplo 19 - Eficacia de una vacuna de virus de influenza equina para perros

5 El virus de la influenza canina aislado en los brotes de gripe en Florida se caracterizaba por estar estrechamente relacionado con varios aislados del virus de influenza equina tipo H3N8. Por análisis de similitud de secuencias de ADN y aminoácidos se demostró que el virus de la influenza canina era muy similar al virus de la influenza equina A/equine/Ohio/03. Se llevó a cabo el siguiente estudio en perros, para determinar la eficacia de vacunas equinas disponibles comercialmente en perros.

10 Procedimiento:

15 Se utilizaron en este estudio 20 mestizos y 20 beagles de aproximadamente 16 meses de edad, de sexos mezclados. Los perros se asignaron aleatoriamente en 6 grupos (Tabla 31) de 6-7 perros cada uno. Los perros de

los grupos 1 y 5 se vacunaron con una vacuna inactivada de influenza equina adyuvada disponible comercialmente (EQUICINE II™, Intervet Inc., Millsboro, DE) a los 16 y 17 meses de edad por vía subcutánea (SC). Los perros de los grupos 2 y 5 se vacunaron con una vacuna de influenza viva modificada de equine/Kentucky/91 en un volumen de 1 ml por vía intranasal (un único orificio nasal). Se recolectaron muestras de sangre el día de la vacunación, el día 7 y 14 tras la primera vacunación (grupos 1, 2, 4, y 5) y tras la segunda vacunación (grupos 1 y 4) para determinar el título de HI utilizando el virus de influenza equina H3N8 y un virus de influenza canina con un protocolo de referencia (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA).

Los vacunados (a los 72 días después de la vacunación final) y los controles se desafiaron por vía oronasal con un virus A/equine/Ohio/03 cultivado en un cultivo celular ( $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub> por perro) en un volumen de 1-2 ml. El virus de desafío se administró a los perros en forma de rocío utilizando un nebulizador (nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, EE. UU.). Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con la influenza durante 12 días post-desafío. Las torundas nasales y orofaríngeas se recolectaron en medio MEM de Earl con antibióticos (neomicina y polimixina B) diariamente desde el día -1 al día 12 post-desafío para el aislamiento del virus. La presencia de virus en las torundas indicaba que el animal estaba excretando el virus en secreciones nasales/orales. A todos los perros se les practicó la eutanasia humanitariamente el día 12 post-desafío y se recolectaron los tejidos pulmonares en formalina tamponada al 10% para la evaluación histopatológica.

**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	Mestizo	EQUICINE II™	2	Subcutánea
5	7	Mestizo	A/KY/91	1	Intranasal
6	6	Mestizo	Control	N/A*	N/A*

\* No aplicable

\*\* EQUICINE II™ está comercializado por Intervet Inc. como una vacuna líquida. EQUICINE II™ contiene virus A/Pennsylvania/63 de influenza (o "A/Pa/63") y virus A/equine/Kentucky/93 de influenza (o "A/KY/93") con carbopol (es decir, HALOGEN® (Intervet Inc.)). Más específicamente, una dosis of EQUICINE II™ contiene: A/Pa/63 a  $10^{6.0}$  EID<sub>50</sub> inactivado, A/KY/93 at  $10^{6.7}$  EID<sub>50</sub>, inactivado, carbopol 0,25% por volumen, y suficiente PBS para crear un volumen total de 1 ml.

\*\*\* A/KY/91 es una vacuna desecada por frío que se reconstituía con agua. Tal reconstitución se realizaba utilizando agua de calidad para vacunas suficiente para dar una dosificación vacunal a un volumen total de 1 ml. La vacuna contenía virus equine/Kentucky/91 influenza (o "A/KY/91"), y se trata por ejemplo en las Patentes de EE. UU. N<sup>OS</sup> 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 contiene A/KY/91 at  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub> 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. La N-Z AMINE AS™ es una fuente refinada de aminoácidos y péptidos producidos por hidrólisis enzimática de la caseína. N-Z AMINE AS™ se comercializa por Kerry Bio-Science (Norwich, NY, EE. UU.).

20

**Resultados:**

Todos los perros vacunados mostraron seroconversión después de la vacunación y los títulos HI oscilaban de 10 a 80 para el grupo de perros vacunados con EQUICINE II™ al compararse con 10 a 40 para el grupo de perros vacunados con A/KY/91 que utilizaba un virus de la influenza equina (tipo H3N8).

Las muestras recolectadas a las 2 semanas tras la vacunación (tras la segunda vacunación de la vacuna EQUICINE II™) se analizaron para la determinación del título HI con un virus de influenza canina así como con un virus de influenza equina (tipo H3N8). Los resultados de HI se muestran en la Tabla 32. Los signos clínicos incluían fiebre (>103°F; >39,4°C) tos ocasional, y descarga nasal leve que se observó después del desafío.

30

**Tabla 32.** Serología – Títulos de HI a las 2 semanas post-vacunación

Grupo	Número de perros	Raza	Tratamiento	Título de HI con
-------	------------------	------	-------------	------------------

**Tabla 32.** Serología – Títulos de HI a las 2 semanas post-vacunación

Grupo	Número de perros	Raza	Tratamiento	Título de HI con			
				Virus de influenza Equina		Virus de influenza 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	Mestizo	Equicine II™	40-80	54	40-80	50
5	7	Mestizo	A/KY/91	10-40	24	40-80	49
6	6	Mestizo	Control	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

\* No aplicable

Entre los beagles, 2 de 6 perros del grupo vacunado con EQUICINE II™ (Grupo 1), 1 de 7 perros en el Grupo 2 de la vacuna A/KY/91 y 2 de 6 perros del grupo control (Grupo 3) tuvieron fiebre. Uno de 6 perros del Grupo 3 (control) era positivo al virus en el sobrenadante del cultivo celular del material de las torundas nasales por el ensayo de hemaglutinación con 0,25% de glóbulos rojos de pollo (CRBC). Uno de 6 perros del grupo de control (Grupo 3) y 1 de 7 perros en el grupo de la vacuna A/KY/91 (Grupo 2) tenía descarga nasal leve durante el periodo de observación post-desafío. No había significación estadística ( $p > 0,05$ ) entre los grupos de control y grupos de vacunas de perros Beagle.

Entre los mestizos, 5 de 7 perros en el grupo de la vacuna EQUICINE II™ (Grupo 4), 1 de 7 perros en el grupo de la vacuna A/KY/91 (Grupo 5) y 5 de 6 perros del grupo control (Grupo 6) tuvieron fiebre. Un perro de cada uno de los Grupos 4 y 6 tuvieron descarga nasal leve, y un perro del Grupo 5 tuvo tos ocasional. Dos de 7 perros en el grupo de la vacuna EQUICINE II™ (Grupo 4) y 3 de 6 perros del grupo control (Grupo 6) eran positivos al virus de influenza en las torundas nasales por el ensayo HA. Ninguno de los perros del grupo A/KY/91 (Grupo 5) fue positivo al virus de influenza en los materiales de la torunda nasal.

Conclusión:

Por serología, se demostró que la vacunación de perros con vacunas de influenza equina disponibles comercialmente estimulaba un nivel moderado de respuesta de anticuerpos contra la influenza. Puede haber alguna diferencia en cuanto a la raza en el desarrollo de signos clínicos relacionados con la influenza en perros después de un desafío con el virus de influenza tipo H3N8. La vacuna de influenza equina viva atenuada (A/KY/91) proporcionaba una protección significativa ( $p < 0,05$ ) del desarrollo de la enfermedad clínica en la temperatura rectal en mestizos. También, la vacuna vírica viva atenuada prevenía contra la eliminación de virus de influenza por las secreciones nasales.

**Ejemplo 20 - Desarrollo del modelo de desafío con influenza canina**

En vista de los informes sobre que la inducción de la enfermedad en caninos con fines de estudio no ha probado ser satisfactoria, se investigó en el siguiente estudio el potencial de la utilización de un virus de influenza canina, H3N8, para desarrollar un modelo de desafío con influenza canina en perros.

Procedimiento:

Se obtuvieron diez mestizos de sexos mezclados en un suministrador comercial, y se alojaron en jaulas en unas instalaciones BSL-2. Los perros se asignaron aleatoriamente en dos grupos de 5 perros cada uno. Como se muestra en la Tabla 33, un grupo se sometió a desafío intratraqueal/intranasal, y el otro grupo por vía oronasal.

**Tabla 33.** Diseño Experimental

Grupo	Número de perros	Vía de desafío
1	5	Intratraqueal/intranasal
2	5	Oronasal

Los perros se desafiaron a aproximadamente 12 semanas de edad. Se utilizó el virus de influenza canino (A/canine/Florida/242/03) cultivado en embrión de pollo como virus de desafío. Cada perro recibió un total de aproximadamente  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub> de virus en un volumen de 2 ml (para la vía oronasal) o 4 ml (para la vía intratraqueal/intranasal).

5 Para el desafío intratraqueal/intranasal, se administraron primero 3 ml del virus desafío en la tráquea, seguido por 5 ml de PBS utilizando un tubo de suministro, que consistía en un tubo traqueal con manguito (Tamaño 4,5/5,0, Sheridan, EE. UU.) y un tubo de alimentación (tamaño 5 Fr, 1,7 mm; 16 pulgadas (41 cm) de longitud, Kendall, EE. UU.), y se administró 1 ml de virus de desafío, seguido por 3 ml de aire atmosférico en los orificios nasales utilizando una jeringuilla.

15 Para el desafío oronasal, el virus de desafío se administró en forma de rocío utilizando un nebulizador (Nebulair™, DVM Pharmaceuticals, Inc., Miami, FL) en un volumen de aproximadamente 2 ml. Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con gripe durante 14 días post-desafío. A los perros se les practicó la eutanasia el día 14 post-desafío, y se recolectaron muestras de tejidos (pulmón y tráquea) en formalina tamponada al 10% para el examen histopatológico.

Resultados:

20 Todos los perros de los grupos 1 y 2 desarrollaron signos clínicos de influenza a las 24 o 48 horas. Cada perro tenía 2 o más de los siguientes signos clínicos: fiebre ( $>103^{\circ}\text{F}$ ;  $>39,4^{\circ}\text{C}$ ), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, arcadas, hemoptisis, y estertores audibles. Los tejidos pulmonares de 5 de 5 perros del grupo 1 y 4 de 5 perros del grupo 2 tenían lesiones histopatológicas que incluían uno o más de los siguientes: bronconeumonía supurativa difusa, bronquitis/bronquiolitis con tapones de exudado de neutrófilos en la luz y marcada agregación de células mononucleares en la mucosa y tejido peribronquiolar, mezcla de exudado en los alveolos con gran número de macrófagos degenerados, células linfáticas y células plasmáticas así como infiltración celular granulocítica, y engrosamiento de los septos alveolares con proliferación de neumocitos tipo II compatibles con o patognomónicos de una infección por virus de influenza. Las muestras de tejidos traqueales eran normales.

30 Conclusión:

Un aislado de influenza canina H3N8 tal como el que se utiliza en este estudio se puede utilizar para inducir enfermedad de influenza canina en perros utilizando uno de los métodos descritos en este estudio o un método similar.

**Ejemplo 21- Desarrollo del modelo de desafío de la influenza canina**

40 Se investigó más en el siguiente estudio el potencial para utilizar un virus de influenza canina, H3N8, para desarrollar un modelo de desafío de influenza canina en perros.

Procedimiento:

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

Grupo	Raza	Número de perros	Dosis de virus de desafío
1	Mestizos	5	$10^{6.8}$ TCID <sub>50</sub>
2	Mestizos	5	$10^{5.8}$ TCID <sub>50</sub>
3	Mestizos	5	$10^{4.8}$ TCID <sub>50</sub>
4	Beagles	5	$10^{6.8}$ TCID <sub>50</sub>

50 Los perros se desafiaron por vía oronasal con un virus de influenza canina virulento, A/canine/Florida/242/2003 (aislado del pulmón de un perro galgo Greyhound con enfermedad de influenza canina (proporcionado por Dr. Cynda Crawford de la Universidad de Florida). El virus de desafío se administró en forma de rocío utilizando un nebulizador

(Nebulair™) en un volumen de aproximadamente 2 ml. Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con la gripe durante 14 días post-desafío.

Resultados:

5 El ochenta por ciento (4 de 5) de los perros de los Grupos 1 y 4, el 100% de los perros en los Grupos 2 y 3, desarrollaron signos clínicos de influenza: fiebre (>103°F; >39,4°C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, arcadas y estertores. Los  
10 signos clínicos que se observaron en beagles eran generalmente menores y más cortos al compararse con los mestizos.

Conclusión:

15 Un aislado H3N8 de influenza canina tal como el que se ha utilizado en este estudio se puede usar para inducir una enfermedad similar a la influenza canina o similar a la tos de las perreras en perros utilizando los métodos descritos en este estudio o un método similar con un intervalo de dosis de desafío de 10<sup>4,8</sup> a 10<sup>6,8</sup> TCID<sub>50</sub>. Había algunas diferencias en los signos clínicos observados en los mestizos y los beagles. En general, los beagles tienden a tener signos clínicos relacionados con la gripe más leves al compararse con los de los mestizos.

## 20 Ejemplo 22 - Estudio de la eficacia de la vacuna para la influenza canina

El siguiente estudio se realizó para evaluar la eficacia de la vacuna con H3N8 de influenza equina en perros contra el virus de la influenza canina.

25 Procedimiento:

Se obtuvieron diecisiete mestizos de 14 semanas de edad y diez beagles de 8 semanas de edad en suministradores comerciales. Los perros se asignaron aleatoriamente en 5 grupos como se muestra en la Tabla 35, y se alojaron en  
30 unas instalaciones de investigación.

Grupo	Edad	Número de perros	Tratamiento	Número de dosis	Edad a la 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	--	--

35 La vacuna que se utilizó en este estudio era una vacuna inactivada de un virus de influenza equina (A/equine/KY/02) y adyuvada con HAVLOGEN®. Para preparar esta vacuna, el virus se inactivó con etilenimina binaria (BEI) utilizando un método de referencia. Cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 6144 unidades HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal al 10%, 0,1% (v/v) de rojo fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH de 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para dar un volumen total de dosis de 1 ml.

40 Los perros de los Grupos 1 y 4 se vacunaron con dos dosis de vacuna. La segunda dosis (es decir, el refuerzo) se administró 4 semanas después de la primera. Los perros del Grupo 2 se vacunaron con una dosis a las 18 semanas de edad. Se recolectaron muestras de sangre para evaluar el título de HI utilizando un protocolo de referencia (por ejemplo, SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA) con un aislado H3N8 de influenza canina los días cero (antes de la vacunación), 7, y 14 tras la primera y la segunda vacunaciones. Aproximadamente 5 días antes del desafío, los  
45 perros se mudaron a una instalación BSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

50 Todas los perros vacunados y sus controles coincidentes en edad se desafiaron por vía oronasal con un virus de influenza canina virulento (10<sup>7,7</sup> TCID<sub>50</sub> de A/Canine/Florida/242/2003 por perro) a las 2 semanas tras la segunda vacunación de los Grupos 1 y 4 y de la primera vacunación del Grupo 2. El virus de desafío se administró en forma de rocío utilizando un nebulizador (Nebulair™) con un volumen de 2 ml por perro. Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con influenza durante 17 días post-desafío. Se recolectaron torundas nasales y orofaríngeas en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte de virus para el aislamiento de virus desde el día - 1 (es decir, un día antes del desafío) al día 17 post-desafío. Se realizó la eutanasia de todos los perros el día 17 post-desafío y se recolectaron muestras pulmonares y traqueales en formalina tamponada al 10% para la

histopatología. Se recolectaron muestras de sangre los días 7 y 14 post-desafío para la determinación del título HI. La asignación de la puntuación utilizada para la observación post-desafío se muestra en la Tabla 36.

Resultados:

5 Todos los perros de los grupos de 2 vacunaciones (Grupos 1 y 4) desarrollaron respuestas de títulos de HI contra el aislado de virus de influenza canina (Tabla 37). A continuación del desafío, un aumento de aproximadamente 4 veces en el título el día 14 post-desafío en todos los grupos, indicaba indirectamente que todos los perros se expusieron al virus de desafío. Todos los perros mostraron uno o más de las siguientes signos de influenza canina: 10 fiebre (>103°F; >39,4°C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, y disnea. Los vacunados tuvieron signos clínicos menos graves, al compararse con los controles coincidentes en edad (Tabla 38). Había una reducción significativa de los signos clínicos debido a la vacunación de 2 dosis en los perros de 8 semanas de edad (p = 0,040) y 14 semanas de edad (p = 0,003) (Grupos 4 y 1 respectivamente). En este experimento, la vacunación de una dosis no proporcionó una 15 reducción significativa (p = 0,294) de los signos clínicos (Grupo 2).

Los resultados del aislamiento vírico se muestran en la Tabla 39. Entre los perros de 14 semanas de edad, se aisló el virus de influenza canina en las muestras de torundas recolectadas en 2 de 7 perros (29%) del grupo de vacunación con 2 dosis (Grupo 1), 3 de 5 perros (60%) del grupo vacunación con una dosis (Grupo 2), y 5 de 5 20 perros (100%) del grupo control (Grupo 3). Entre los perros de 8 semanas de edad, el virus se aisló de 1 de 5 perros (20%) del grupo de vacunación con 2 dosis (Grupo 4), y 4 de 5 perros (80%) del grupo control (Grupo 5). Aunque había una reducción en el número de perros (60% frente 100%) positivos al virus de influenza canina en las muestras de las torundas entre el grupo de vacunación con una dosis (Grupo 2) y el grupo control (Grupo 3), la diferencia no era estadísticamente significativa (p = 0,222).

25 Se realizó la evaluación histopatológica de las lesiones en las muestras de tejido pulmonar y traqueal para identificar lesiones compatibles con o patognomónicas de la enfermedad influenza canina. Esto incluye, por ejemplo, la determinación de la existencia de uno o más de los siguientes: áreas de bronconeumonía supurativa, peribronquitis/peribronquiolitis con agregación celular mononuclear (linfocitos, células plasmáticas); presencia de 30 tapones de restos celulares granulocíticos en la luz; hiperplasia del epitelio respiratorio; exudado mezclado en los alveolos con gran cantidad de células granulocíticas y restos celulares; agregados de macrófagos (degenerados), células plasmáticas, y linfocitos; y engrosamiento de los septos alveolares con proliferación de neumocitos tipo II.

35 La Tabla 40 proporciona un resumen de la extensión de las lesiones en los perros en este experimento. Entre los perros de 14 semanas de edad, las lesiones pulmonares eran menos extensas y menos graves en 5 de 7 perros del grupo de vacunación con 2 dosis (Grupo 2), y 4 de 5 perros del grupo de vacunación con 1 dosis (Grupo 1). Todos los perros controles (Grupo 3) tuvieron lesiones graves y extensas los que sugieren que no tenían protección. No había diferencia en las lesiones traqueales con respecto a la vacunación de 1 o 2 dosis entre los perros de 14 40 semanas de edad. Entre los perros de 8 semanas de edad, no hubo diferencia entre las lesiones de los perros vacunados con 2 dosis y los perros de control. Ninguno de los perros tuvo lesiones traqueales.

Conclusión

45 Los resultados de este estudio demuestran que: (1) el virus de influenza equina H3N8 inactivado puede inducir una respuesta de anticuerpos HI de reacción cruzada en los perros vacunados, (2) el uso de una vacuna del virus de influenza equina H3N8 puede reducir la gravedad de la enfermedad influenza canina en perros, y (3) el uso de una vacuna del virus de influenza equina H3N8 puede reducir la excreción vírica por secreciones nasales y/u orales.

<b>Tabla 36. Signos clínicos y sistema de puntuación</b>	
<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
<b>Temperatura</b>	
<103,0°F (<39,4°C)	0
103,0 - 103,9°F (39,4-	2
104,0-104,9°F (40,0-40,5°C)	3
> 105,0°F (>40,6°C)	4
<b>Tos</b>	
Sin tos	0
Ocasional	2

<b>Tabla 36.</b> Signos clínicos y sistema de puntuación	
<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
Paroxística	4
<b>Estornudos</b>	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
<b>Descarga nasal</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Descarga Ocular</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Hemoptisis</b>	
No	0
Sí	5
<b>Depresión</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anorexia</b>	
No	0
Sí	1
<b>Signos respiratorios</b>	
Ninguno	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
<b>Expectoración mucosa</b>	
No	0
Sí	2
<b>Vómitos</b>	
No	0

**Tabla 36.** Signos clínicos y sistema de puntuación

<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
Sí	1
<b>Anormalidades fecales</b>	
No	0
Sí	1

**Tabla 37.** Serología - Títulos de inhibición de hemaglutinación

Grupo N°	ID del Perro	Edad (semanas)	Tratamiento	Número de dosis	Título de HI							
					Días tras la primera vacunación de los Grupos 1 y 4						Días post-desafío	
					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
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	> 640
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



**Tabla 37. Serología - Títulos de inhibición de hemaglutinación**

Grupo N°	ID del Perro	Edad (semanas)	Tratamiento	Número de dosis	Título de HI							
					Días tras la primera vacunación de los Grupos 1 y 4						Días post-desafío	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
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 del desafío

**Tabla 38. Análisis de la puntuación clínica total de enfermedad influenza canina**

Grupo	Tratamiento	Número de dosis de vacuna	Edad a la primera vacunación de los Grupos 1 y 4	Media total de Puntuación por perro	valor de p*
1	Vacunado	2	14 semanas	8.7	0.003 (Grupo 1 vs. 3)
2	Vacunado	1	14 semanas (estos perros se vacunaron una vez, cuando tenían 18 semanas de edad)	21.8	0.294 (Grupo 2 vs. 3)
3	Control	--	14 semanas (estos perros no se vacunaron)	25.4	--

<b>Tabla 38.</b> Análisis de la puntuación clínica total de enfermedad influenza canina					
<u>Grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Número de dosis de vacuna</u>	<u>Edad a la primera vacunación de los Grupos 1 y 4</u>	<u>Media total de Puntuación por perro</u>	<u>valor de p*</u>
4	Vacunado	2	8 semanas	2.0	0.040 (Grupo 4 vs. 5)
5	Control	--	8 semanas (estos perros no se vacunaron)	5.4	--

\*Analizado utilizando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 8.2 (los grupos de vacunas se compararon utilizando el ensayo de rangos sumatorios de Wilcoxon)



**Tabla 40.** Evaluación histopatológica de las muestras de tejido

Grupo Nº	ID del 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 consistente con o patognomónica de una infección de influenza  
 "+/-" Lesión leve (no concluyente)  
 "-" Normal

**Ejemplo 23. Estudio de eficacia de la vacuna para la influenza canina**

5 El siguiente estudio se realizó para determinar la eficacia de una vacuna polivalente de H3N8 de influenza equina contra el virus de influenza canina en perros.

Procedimiento:

10

Se obtuvieron diecisiete beagles de 15 semanas de edad en un suministrador comercial. Los perros se asignaron aleatoriamente en 3 grupos como se muestra en la Tabla 41, y se alojaron en las instalaciones de investigación.

<b>Tabla 41. Diseño experimental</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Número de perros</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Número de dosis</b>	<b>Edad a la vacunación (semanas)</b>
1	7	Vacunado	2	15 y 19
2	5	Vacunado	1	19
3	5	Control	--	--

5 La vacuna utilizada en este estudio era una vacuna inactivada de influenza equina (A/equine/KY/02, A/equine/KY/93, y A/equine/NM/2/93), adyuvada con HAVLOGEN®. Para preparar esta vacuna, los virus se inactivaron con etilenimina binaria (BEI) utilizando un método de referencia. Cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 2048 unidades de HA de cada virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal al 10%, 0,1% (v/v) de rojo fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH a 6,8 a 7,2 y suficiente PBS para dar un volumen de dosis total de 1 ml.

10 Los perros del Grupo 1 se vacunaron con dos dosis de vacuna. La segunda dosis (es decir, el refuerzo) se administró 4 semanas después de la primera dosis. Los perros del Grupo 2 se vacunaron con 1 dosis de vacuna a las 19 semanas de edad. Se recolectaron muestras de sangre para evaluar el título de HI utilizando un protocolo de referencia con un aislado H3N8 de influenza canina los días cero (antes de la vacunación), 7 y 14 después de la primera y segunda vacunaciones. Siete días antes del desafío, los perros se mudaron a una instalación BSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

15 Todos los perros vacunados y los de control coincidentes en edad, se desafiaron por vía oronasal con un virus de influenza canina virulento ( $10^{7,3}$  TCID<sub>50</sub> de A/Canine/Florida/242/2003 por perro) a las 2 semanas tras la segunda vacunación del Grupo 1 y la primera vacunación del Grupo 2. El virus de desafío se administró en forma de rocío utilizando un nebulizador (Nebulair™) con un volumen de 2 ml por perro. Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con la influenza durante 14 días post-desafío. Se practicó la eutanasia de todos los perros el día 14 post-desafío, y se recolectaron muestras pulmonares y traqueales en formalina tamponada al 10% para la histopatología. Se recolectaron muestras de sangre los días 7 y 14 post-desafío para la determinación del título de HI. Las asignaciones de la puntuación de signos clínicos que se utilizó para la observación post-desafío se muestran en la Tabla 42.

Resultados:

20 Todos los perros vacunados desarrollaron una respuesta de anticuerpos con título HI contra el aislado del virus de influenza canina (Tabla 43). Después del desafío, un aumento de aproximadamente 4 veces en el título de HI el día 14 post-desafío en comparación con el título de HI pre-desafío indica indirectamente que todos los perros se expusieron al virus de desafío. Todos los perros mostraron signos de enfermedad influenza canina y cada perro demostró uno o más de los siguientes signos clínicos: fiebre ( $>103^{\circ}\text{F}$ ;  $>39,4^{\circ}\text{C}$ ), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, y disnea. Los vacunados tenían signos clínicos menos graves, al compararse con los controles coincidentes en edad (Tabla 44). Había una reducción significativa ( $p = 0,028$ ) de los signos clínicos debido a la vacunación de los perros con 2 dosis (Grupo 1). La vacunación con 1 dosis no proporcionaba una reducción significativa ( $p = 0,068$ ) de los signos clínicos (Grupo 2).

25 Como en el Ejemplo 22, se realizó la evaluación de las lesiones histopatológicas de las muestras de tejido pulmonar y traqueal para identificar lesiones compatibles con o patognomónicas de enfermedad de influenza canina. La tabla 45 proporciona un resumen de la extensión de las lesiones de los perros en este experimento. Entre los perros de 15 semanas de edad, la vacunación de los perros con 1 o 2 dosis prevenía las lesiones pulmonares en todos los perros. Cuatro de 5 perros controles (el 80%) tenían bronconeumonía supurativa grave consistente con la enfermedad influenza. Uno de 7 perros del grupo de 2 dosis vacuнаles (Grupo 1) y 1 de 5 perros del grupo control (Grupo 3) tenían lesiones leves en la tráquea sugestivas de traqueítis que se podrían atribuir a enfermedad influenza.

30 Conclusión:

35 Los resultados de este estudio demuestran que 1) el virus H3N8 de influenza equina inactivado puede inducir una respuesta de anticuerpos HI de reacción cruzada contra el virus de influenza canina en perros vacunados, y 2) El uso de una vacuna con el virus H3N8 de influenza equina puede reducir la gravedad de la enfermedad vírica de influenza canina en perros.

<b>Tabla 42.</b> Signos clínicos y sistema de puntuación	
<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
<b>Temperatura</b>	
<103,0°F (<39,4°C)	0
103,0 - 103,9°F (39,4-	2
104,0-104,9°F (40,0-40,5°C)	3
> 105,0°F (>40,6°C)	4
<b>Tos</b>	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxística	4
<b>Estornudos</b>	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
<b>Descarga nasal</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Descarga Ocular</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Hemoptisis</b>	
No	0
Sí	5
<b>Depresión</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anorexia</b>	
No	0
Sí	1
<b>Signos respiratorios</b>	
Ninguno	0

**Tabla 42.** Signos clínicos y sistema de puntuación

<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
<b>Expectoración mucosa</b>	
No	0
Sí	2
<b>Vómitos</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anormalidades fecales</b>	
No	0
Sí	1

**Tabla 43.** Serología – Títulos de inhibición de hemaglutinación

Grupo Nº	ID del Perro	Tratamiento	Número de dosis	Título HI							
				Días tras la primera vacunación del Grupo 1						Días post-desafío	
				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

**Tabla 43.** Serología – Títulos de inhibición de hemaglutinación

\*Primera vacunación - Grupo 1  
 \*\*Segunda vacunación - Grupo 1; Primera vacunación - Grupo 2  
 \*\*\*Día del desafío

**Tabla 44.** Análisis de la puntuación total de enfermedad influenza canina

Grupo	Tratamiento	Número de dosis	Edad a la primera vacunación del Grupo 1	Media de la puntuación total por perro	Valor de p*
1	Vacunado	2	15 semanas	6,3	0,028 (Grupo 1 vs. 3)
2	Vacunado	1	15 semanas (estos perros se vacunaron una vez , cuando tenían 19 semanas de edad)	14,2	0,068 (Grupo 2 vs. 3)
3	Control	--	15 semanas (estos perros no se vacunaron)	24,4	--

\*Analizado utilizando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 8.2 (los grupos de vacunas se compararon utilizando el ensayo de rangos sumatorios de Wilcoxon)

5

**Tabla 45.** Evaluación histopatológica de las muestras de tejido

Grupo N°	ID del Perro	Tratamiento	Número de dosis	Lesión microscópica (Histopatología)	
				Pulmones	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 consistente con o patognomónica de una infección de influenza  
 "+/-" Lesión leve (no concluyente)  
 "-" Normal



**Ejemplo 24 - Estudio de eficacia de la vacuna para la influenza canina**

- 5 El siguiente estudio se llevó a cabo para determinar: (1) la eficacia de las vacunas monovalentes frente a las polivalentes de H3N8 de influenza equina contra el virus de la influenza canina en perros, y (2) el efecto de la vía de administración en la eficacia de la vacuna.

Procedimiento:

- 10 Se obtuvieron treinta perros mestizos de 10 semanas de edad en un suministrador comercial. Los perros se asignaron aleatoriamente en 6 grupos como se muestra en la tabla 46, y se alojaron en unas instalaciones de investigación.

**Tabla 46.** Diseño experimental

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

- 15 Se utilizaron tres tipos de vacunas (VAX-1, VAX-2, y VAX-3). La VAX-1 era una vacuna inactivada monovalente del virus (A/equine/KY/02) de la influenza equina adyuvada con HAVLOGEN® (10% v/v), 6144 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal al 10%, 0,1% (v/v) de rojo fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH a 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para dar un volumen total de la dosis de 1 ml. La VAX-2 era una vacuna inactivada monovalente del virus (A/equine/KY/02) de la influenza equina adyuvada con HAVLOGEN® (10% v/v), 4096 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal al 10%, 0,1% (v/v) de rojo fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH a 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para dar un volumen total de la dosis de 1 ml. La VAX-3 era una vacuna inactivada polivalente de virus (A/equine/KY/02, A/equine/KY/93, y A/equine/NM/2/93 ) de influenza equina, adyuvada con HAVLOGEN®, y contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 2048 unidades de HA de virus inactivado por cepa, 0,1% (v/v) de timerosal al 10%, 0,1% (v/v) de rojo fenol, suficiente NaOH para ajustar el pH a 6,8 a 7,2, y suficiente PBS para dar un volumen total de la dosis de 1 ml. Todos los virus de influenza utilizados en la formulación de vacunas se inactivaron con etilenimina binaria (BEI) utilizando un método de referencia.

- 20 Las vacunas y las vías de administración para cada grupo se describen en la Tabla 46. Todos los perros de los grupos vacunados se vacunaron bien por vía intranasal (IN) o bien por vía subcutánea (SC), y cada perro recibió 2 dosis. La segunda dosis (es decir, el refuerzo) se administró 4 semanas después de la primera dosis. Se recolectaron muestras de sangre para evaluar el título de HI utilizando un protocolo de referencia con un aislado H3N8 de influenza canina los días cero (antes de la vacunación) 7, y 14 tras la primera y segunda vacunaciones.
- 25 Siete días antes del desafío, los perros se mudaron a unas instalaciones BSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

- 30 Todos los perros vacunados y controles coincidentes en edad se desafiaron por vía oronasal con un virus de influenza canina virulento ( $10^{7,4}$  TCID<sub>50</sub> de A/Canine/Florida/242/2003 por perro) a las dos semanas tras la segunda vacunación. El virus de desafío se administró en forma de rocío utilizando un nebulizador (Nebulair™) con un volumen de 2 ml por día. Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con influenza durante 14 días post-desafío. Se recolectaron muestras de sangre los días 7 y 14 post-desafío para determinar los títulos de HI. Se practicó la eutanasia a todos los perros el día 14 post-desafío, y se recolectaron muestras de pulmón y tráquea en formalina tamponada al 10% para la histopatología. La asignación de puntuaciones que se utilizó en la observación post-desafío se muestran en la Tabla 47.

45 Resultados:

- 50 Todos los perros vacunados por vía SC desarrollaron respuestas de anticuerpos con títulos de HI frente al aislado de virus de la influenza, independientemente del tipo de vacuna (Tabla 48). Ninguno de los perros de los grupos de vacunación IN (es decir, los Grupos 1, 3, y 5) desarrollaron respuestas de anticuerpos con títulos de HI para el aislado de virus de influenza canina, independientemente del tipo de vacuna, durante el periodo tras la vacunación.

Había, sin embargo, un aumento del título de 4 veces el día 14 post-desafío en todos los perros indicando indirectamente que todos los perros se expusieron al virus de desafío (Tabla 47).

5 Todos los perros mostraron uno o más de los siguientes signos de influenza canina: fiebre (>103°F; >39,4°C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, y disnea. Los vacunados tenían signos clínicos menos graves, en comparación con los controles coincidentes en edad (Tabla 49). Había una reducción significativa de los signos clínicos vacunados con VAX-3 por vía SC (Grupo 4). En este experimento, la administración IN de VAX-1, VAX-2, o VAX-3 no proporcionaba una reducción significativa de los signos clínicos del virus de influenza canina.

10 Como en los Ejemplos 22 y 23, la evaluación histológica de las lesiones en las muestras de tejidos de pulmón y de tráquea se llevaron a cabo para identificar lesiones compatibles con o patognomónicas de enfermedad influenza canina. La Tabla 50 proporciona un resumen de la extensión de las lesiones en los perros en este experimento. 15 Cinco de 5 perros control (Grupo 6) tenía lesiones consistentes con infección por influenza. Dos de 5 perros vacunados con VAX-2 por vía SC (Grupo 2), y 3 de 5 perros vacunados con VAX-3 por vía SC (Grupo 4) estaban libres de lesiones de pulmón relacionadas con influenza. Todos los perros que recibieron la vacuna por vía intranasal, independientemente del tipo de vacuna, tenían lesiones pulmonares graves consistentes con una infección por influenza. Las lesiones en la tráquea observadas en este estudio eran muy leves.

20 Conclusión:

Los resultados de este estudios demuestran que: (1) el virus H3N8 de influenza equina puede inducir una respuesta de anticuerpos HI de reacción cruzada contra el virus de influenza canina en perros vacunados por vía SC, (2) la administración intranasal de las vacunas monovalentes (VAX-1 y VAX-2) o polivalente (VAX-3) no era eficaz en 25 perros, y (3) la administración subcutánea de vacuna polivalente (VAX-3) proporcionaba una reducción significativa (p = 0,016) en la gravedad de la enfermedad en perros por virus de influenza canina.

**Tabla 47. Signos clínicos y sistema de puntuación**

<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
<b>Temperatura</b>	
<103,0°F (<39,4°C)	0
103,0 - 103,9°F (39,4-	2
104,0-104,9°F (40,0-40,5°C)	3
> 105,0°F (>40,6°C)	4
<b>Tos</b>	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxística	4
<b>Estornudos</b>	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
<b>Descarga nasal</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Descarga Ocular</b>	

<b>Tabla 47. Signos clínicos y sistema de puntuación</b>	
<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Hemoptisis</b>	
No	0
Sí	5
<b>Depresión</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anorexia</b>	
No	0
Sí	1
<b>Signos respiratorios</b>	
Ninguno	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
<b>Expectoración mucosa</b>	
No	0
Sí	2
<b>Vómitos</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anormalidades fecales</b>	
No	0
Sí	1

**Tabla 48. Serología- Títulos de inhibición de la hemaglutinación**

Grupo N°	ID del perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de dosis	Título HI										
					Días tras vacunación						Días post-desafío				
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14	28	42	84
1	248	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	7	14
1	501	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	40
1	502	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	160	160
1	469	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
1	46A	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
2	232	Vacunado	SC	2	< 10	< 10	< 10	< 10	20	20	40	320	640		
2	511	Vacunados	SC	2	< 10	10	10	20	20	20	20	160	640		
2	514	Vacunado	SC	2	< 10	< 10	40	40	80	40	40	160	320		
2	461	Vacunado	SC	2	< 10	10	10	20	20	20	20	>640	>640		
2	463	Vacunado	SC	2	< 10	10	40	80	80	80	40	80	320		
3	246	Vacunado	IN	2	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	40		
3	505	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80		
3	506	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160		
3	464	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80		
3	465	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160		
4	23B	Vacunado	SC	2	< 10	10	10	40	40	40	20	160	160		
4	247	Vacunado	SC	2	< 10	< 10	< 10	20	20	20	20	320	320		
4	508	Vacunado	SC	2	< 10	10	40	40	80	80	80	320	320		
4	512	Vacunado	SC	2	< 10	< 10	20	20	80	80	80	160	160		
4	516	Vacunado	SC	2	< 10	10	10	20	80	80	80	>640	>640		
5	503	Vacunado	IN	2	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160		
5	513	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80		
5'	462	Vacunado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	320		

(continuación)

Tabla 48. Serología – Títulos de inhibición de la hemaglutinación													
Grupo N°	ID del perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de dosis	Título de HI								
					Días tras vacunación					Días post-desafío			
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14	
5	466	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80
5	46B	Vacunado	IN	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	236	Control	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	504	Control	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	160
6	507	Control	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	515	Control	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160
6	468	Control	--	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	160

\* Primera vacunación  
 \*\* Segunda vacunación  
 \*\*\* Día del desafío

**Tabla 49.** Análisis de la puntuación total de enfermedad influenza canina

Grupo	Tratamiento	Vía de vacunación	Media de la puntuación total por perro	Valor de p*
1	VAX-1	IN	35,2	0,500 (Grupo 1 vs, 6)
2	VAX-2	SC	31,0	0,345 (Grupo 2 vs, 6)
3	VAX-2	IN	39,4	0,631 (Grupo 3 vs, 6)
4	VAX-3	SC	13,0	0,016 (Grupo 4 vs, 6)
5	VAX-3	IN	42,6	0,790 (Grupo 4 vs, 6)
6	Control	--	36,8	--

\*Analizado utilizando un procedimiento NPARIWAY de SAS® Versión 8.2 (los grupos de vacunas se compararon utilizando el ensayo de rangos sumatorios de Wilcoxon)

**Tabla 50.** Evaluación histopatológica de las muestras de tejido

Grupo Nº	ID del Perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de dosis	Lesión microscópica (Histopatología)	
					Pulmones	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	SC	2	+	-
2	511	Vacunado	SC	2	+	-
2	514	Vacunado	SC	2	-	-
2	461	Vacunado	SC	2	+	-
2	463	Vacunado	SC	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	SC	2	-	-
4	247	Vacunado	SC	2	+/-	-
4	508	Vacunado	SC	2	-	-
4	512	Vacunado	SC	2	-	+/-
4	516	Vacunado	SC	2	+	+
5	503	Vacunado	IN	2	+	+/-
5	513	Vacunado	IN	2	+	+
5	462	Vacunado	IN	2	+	+/-
5	466	Vacunado	IN	2	+	+

**Tabla 50.** Evaluación histopatológica de las muestras de tejido

Grupo Nº	ID del Perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de dosis	Lesión microscópica (Histopatología)	
					Pulmones	Tráquea
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 consistente con o patognomónica de una infección de influenza  
 "+/-" Lesión leve (no concluyente)  
 "-" Normal

### Ejemplo 25 - Estudio de eficacia de la vacuna de influenza canina

5 La enfermedad influenza canina está producida por un virus H3N8 de influenza (CIV). El CIV está muy estrechamente relacionado con los virus H3N8 equinos (Crawford y col., 2005) e infecta todos los perros expuestos. Aproximadamente el 80% de los perros expuestos desarrolla signos clínicos. En el siguiente estudio se determinaron la eficacia de una vacuna inactivada del virus H3N8 de la influenza equina y una vacuna de virus de influenza canina.

10 Procedimiento:

15 Se utilizaron en el presente estudio treinta y cinco beagles y cinco mestizos. Los beagles se asignaron aleatoriamente en tres grupos (Tabla 51). Todos los mestizos se asignaron al grupo control (Grupo 3). Todos los perros se alimentaron con una dieta de crecimiento de referencia y el agua estaba disponible ad libitum.

**Tabla 51.** Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de perros	Edad a la vacunación (semanas)	Desafío
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

20 Los perros de los grupos 1 y 2 fueron vacunados con VAX-1 o VAX-2 (Tabla 51). La VAX-1 era una vacuna inactivada del virus (A/equine/KY/02) de la influenza equina adyuvada con HAVLOGEN®. Para la preparación de la vacuna, el virus se inactivó con etilenimina binaria (BEI) utilizando un método de referencia. Cada dosis de vacuna contenía HAVLOGEN® (10% v/v), 6144 unidades de HA del virus inactivado, 0,1% (v/v) de timerosal al 10%, 0,1% (v/v) de rojo fenol y suficiente PBS para dar un volumen total de la dosis de 1 ml y suficiente NaOH para ajustar el pH a 6,8 a 7,2.

25 La VAX-2 era una vacuna inactivada monovalente del virus (A/canine/FI/43/2004) de la influenza canina adyuvada con CARBIGEN™. El virus A/canine/FI/43/2004 se inactivó con etilenimina binaria (BEI) utilizando un método de referencia. Cada dosis de vacuna contenía un 5% por masa de CARBIGEN™, aproximadamente 1280 unidades de HA del virus inactivado, suficiente PBS para dar un volumen total de la dosis de 1 ml y suficiente NaOH para ajustar el pH a 7,2 a 7,4. Las muestras de suero se recolectaron de todos los perros el día de la primera y la segunda vacunación, los días 7 y 14 tras la primera y segunda vacunaciones, y en el pre-desafío para determinar los títulos HI utilizando un protocolo de referencia de virus H3N8 del virus de la influenza equina (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Siete días antes del desafío, los perros se mudaron a unas instalaciones ABSL-2 y se alojaron en jaulas individuales.

35 Todos los perros vacunados y los de control coincidentes en edad se desafiaron por vía oronasal con virus virulento de influenza canina ( $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub> de A/Canine/Florida/242/2003 por perro) a las dos semanas tras la segunda vacunación. El virus de desafío se administró en forma de rocío (2 ml/perro) utilizando un nebulizador (Nebulair™). Los perros se observaron para detectar signos clínicos relacionados con influenza durante 14 días post-desafío. Se recolectaron diariamente torundas nasales y orofaríngeas en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte de

virus para el aislamiento de virus, desde el día -1 (es decir, un día antes del desafío) hasta el día 14 post-desafío. Las muestras de sangre se recolectaron los días 7 y 14 post-desafío para la determinación del título de HI. Las asignaciones de la puntuación de los signos clínicos utilizados para la observación post-desafío se muestran en la Tabla 52.

5 Resultados:

10 Todos los perros vacunados (Grupos 1 y 2) desarrollaron respuestas de títulos de anticuerpos HI contra el aislado de virus de influenza canina (Tabla 53). Todos los perros mostraban uno o más de los siguientes signos de influenza canina: fiebre (>103°F; >39,4°C), tos, descarga ocular serosa o mucopurulenta, descarga nasal serosa o mucopurulenta, vómitos, diarrea, depresión, y anorexia. Los vacunados tenían signos clínicos menos graves, al compararlos con los controles de edad coincidente (Tabla 54). Había una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) de los signos clínicos en los perros vacunados bien con VAX-1 (Grupo 1) o con VAX-2 (Grupo 2).

15 Los resultados del aislamiento del virus se muestran en las Tablas 55 y 56. Después del desafío con un virus virulento de influenza canina, se aisló el virus de influenza canina de 5 de 15 perros (33%) del Grupo 1 (VAX-1), 0 de 5 perros (0%) del Grupo 2 (VAX-2) y 17 de 20 controles (85%) (Grupo 3). Tanto los vacunados con la vacuna inactivada de virus de influenza equina (VAX-1) como con el virus de influenza canina (VAX-2) demostraron una reducción significativa ( $p = 0,004$ ) de la eliminación de virus en las secreciones nasal u oral o ambas (Tabla 55) en comparación con los controles.

Conclusión:

25 Los resultados de este estudio demuestran que: (1) las vacunas de virus H3N8 de influenza equina inactivado y virus de la influenza canina pueden inducir respuestas de anticuerpos HI reactivos en perros vacunados, (2) el uso de la vacuna de virus H3N8 de influenza equina o de virus de influenza canina pueden reducir la gravedad de la enfermedad por virus de influenza canina en perros, y (3) el uso de una vacuna de virus H3N8 de influenza equina o de virus de influenza canina puede reducir la excreción de virus en las secreciones nasal y/u oral.

**Tabla 52.** Signos clínicos y sistema de puntuación

<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
<b>Temperatura</b>	
<103,0°F (<39,4°C)	0
103,0 - 103,9°F (39,4-	2
104,0-104,9°F (40,0-40,5°C)	3
> 105,0°F (>40,6°C)	4
<b>Tos</b>	
Sin tos	0
Ocasional	2
Paroxística	4
<b>Estornudos</b>	
Sin estornudos	0
Ocasional	1
Paroxísticos	2
<b>Descarga nasal</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3



**Tabla 52.** Signos clínicos y sistema de puntuación

<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación por día</b>
<b>Descarga Ocular</b>	
Sin descarga	0
Serosa -ligera	1
Serosa -copiosa	1
Mucopurulenta-ligera	2
Mucopurulenta-copiosa	3
<b>Hemoptisis</b>	
No	0
Sí	5
<b>Depresión</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anorexia</b>	
No	0
Sí	1
<b>Signos respiratorios</b>	
Ninguno	0
Estertores	3
Disnea	4
Jadeos	5
<b>Expectoración mucosa</b>	
No	0
Sí	2
<b>Vómitos</b>	
No	0
Sí	1
<b>Anormalidades fecales</b>	
No	0
Sí	1

**Tabla 53.** Serología – Títulos de inhibición de hemaglutinación

Grupo N°	ID del Perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Título HI							
				Días tras vacunación				Días post-desafío			
				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

Tabla 53. Serología – Títulos de inhibición de hemaglutinación											
Grupo Nº	ID del Perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Título HI							
				Días tras vacunación				Días post-desafío			
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
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
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	< 10	to	< 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
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 del desafío

Tabla 54. Analysis of total canine influenza disease clinical scores			
Grupo	Tratamiento	Media de la puntuación total por perro	Valor de p*

**Tabla 54.** Analysis of total canine influenza disease clinical scores

Grupo	Tratamiento	Media de la puntuación total por perro	Valor de p*
1	VAX-1	9,1	< 0,001 (Grupo 1 vs. 3)
2	VAX-2	5,4	< 0,001 (Grupo 2 vs. 3)
3	Control	24,1	--

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

**Tabla 55.** Eliminación de virus post-desafío

Grupo	Tratamiento	Porcentaje de perros que excretan virus	Valor de p*
1	VAX-1	33% (5/15)	0,004 (Grupo 1 vs. 3)
2	VAX-2	0% (0/5)	0,004 (Grupo 2 vs. 3)
3	Control	85% (17/20)	--

\*Analizado utilizando un procedimiento FREQ de SAS® (Versión 9.1) y Valor de p asociado con el ensayo exacto de Fisher

**Tabla 56.** Serología – Títulos de inhibición de la hemaglutinación

Grupo N°	ID del perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Días post-desafío																
				-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	N	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	P	N	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	P	N	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	P	N	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	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZL	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	AZN	Control	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

(continuación)

Tabla 56. Serología – Títulos de inhibición de la hemaglutinación																							
Grupo N°	ID del perro	Tratamiento	Vía de vacunación	Días post-desafío																			
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
3	BAB	Control	N/A	N	N	N	P	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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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- No se aisló virus de las torundas orales o nasales

P - Virus aislados de las torundas orales o nasales o torundas nasales y orales

<b>Tabla 57. Similitudes en las secuencias de aminoácidos codificadas por el gen de Hemaglutinina, neuraminidasa y nucleoproteína entre los virus de influenza</b>		
<b>Gen (Canine /Florida/43/2004)</b>	<b>Similitud de la secuencia de aminoácidos</b>	<b>Gen de virus de influenza utilizados para la comparación</b>
Hemaglutinina	88	equine/Algiers/72
HA	90	equine/Sao paulo/6/69
HA	91	equine/Miami/1/63
HA	93	equine/Newmarket/79
HA	94	equine/Kentucky/1/81
HA	95	Equi-2/Ludhiana/87
HA	96	Equine/Alaska/1/91
HA	97	equine/Tennessee/5/86
HA	98	equine/Kentucky/5/02
HA	99	equine/Ohio/1/2003
HA	99	canine/Florida/242/2003
Neuraminidasa	88	Eq/Algiers/72
NA	90	equine/Sao Paulo/6/69
NA	91	equine/Miami/1/63
NA	93	equine/Newmarket/79
NA	94	equine/Kentucky/1/81
NA	95	Equi-2/Ludhiana/87
NA	96	equine/Santiago/85
NA	97	equine/Tennessee/5/86
NA	98	equine/Kentucky/5/2002
NA	99	equine/Ohio/1/2003
NA	99	canine/Florida/242/2003
Nucleoproteína ("NP")	94	equi/Miami/1/63
NP	97	equine/Kentucky/1/81
NP	99	equine/Kentucky/5/02
NP	99	equine/Ohio/1/2003
NP	99	canine/Florida/242/2003

Las palabras "comprender", "comprende" y "comprendiendo" en la presente patente (incluyendo las reivindicaciones) se tienen que interpretar de manera inclusiva más que exclusiva.

5 Se pretende que la descripción detallada anterior de las realizaciones preferidas solamente sea para familiarizar a otros expertos en la técnica con la invención, sus principios, y su aplicación práctica, de manera que otros expertos en la técnica puedan adaptar y aplicar la invención en sus numerosas formas para que se adapten mejor a las necesidades de un uso en particular. La presente invención, por lo tanto, no se limita a las realizaciones anteriores, que pueden modificarse de varias formas.

10

## Referencias

- 5 Patente de EE. UU. N° 5.106.739, Patente de EE. UU. N° 5.034.322, Patente de EE. UU. N° 6.455.760, Patente de EE. UU. N° 6.696.623, Patente de EE. UU. N° 4.683.202, Patente de EE. UU. N° 4.683.195, Patente de EE. UU. N° 4.800.159, Patente de EE. UU. N° 4.965.188, Patente de EE. UU. N° 5.994.056, Patente de EE. UU. N° 6.814.934, Patente de EE. UU. N° 6.436.408, Patente de EE. UU. N° 6.398.774, Patente de EE. UU. N° 6.177.082, Solicitud de Pat. de EE. UU. Publicada N° 20040078841, Solicitud de Pat. de EE. UU. Publicada N° 20040067506, Solicitud de Pat. de EE. UU. Publicada N° 20040019934, Solicitud de Pat. de EE. UU. Publicada N° 20030177536, Solicitud de Pat. de EE. UU. Publicada N° 20030084486, Solicitud de Pat. de EE. UU. Publicada N° 20040123349.
- 10 Greyhound Daily News, 1/28/99. National Greyhound Association (NGA), Abilene, Kansas: <http://www.NGAgreyhounds.com>.
- 15 Personal communication, Dr. William Duggar, veterinarian at Palm Beach Kennel Club, West Palm Beach, Florida.
- Altschul, S. F. y col. (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" *J. Mol. Biol.* 215:402-410.
- Altschul, S. F. y col. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs" *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- 20 An, G. (1987) "Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis" *Methods Enzymol.* 153:292-305.
- 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 y K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285.
- Burleson, F. y col. (1992) *Virology: A Laboratory Manual* (Academic Press).
- 25 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.
- Crawford, P.C. y col. (2005) "Transmission of equine influenza virus to dogs" *Science* 310:482-485.
- Chang, C.P. y col. (1976) "Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan" *Int J Zoonoses* 3:61-64.
- 30 Dacso, C.C. y col. (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.
- Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5:164.
- 35 Fields y col. (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.
- Fouchier y col., (2000) *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11):4096-4101.
- Good, X. y col. (1994) "Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase" *Plant Molec. Biol.* 26:781-790.
- 40 Guan, Y. y col. (2004) "H5N1 influenza: a protean pandemic threat" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8156-8161.
- Guo, Y. y col. (1992) "Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China" *Virology* 188:245-255.
- Houser, R.E. y col. (1980) "Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza" *Can J Comp Med* 44:396-402.
- 45 Karasin, A.I. y col. (2000) "Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada" *J Virol* 74:9322-9327.
- Karlin S. y 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.
- 50 Karlin S. y 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. y col., (1989) "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics" *J Virol* 63:4603-4608.
- Keawcharoen, J. y col. (2004) "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards" *Emerg Infect Dis* 10:2189-2191.
- 55 Kendal, A. P. y col. (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.
- Kilbourne, E.D. y col. (1975) "Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs" *Intervirology* 6:315-318.
- 60 Kimura, K. y col. (1998) "Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host" *Mayo Clin Proc* 73:243-245.
- Klimov, A. I. y col. (1992a) "Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Lenin grad/134/57 (H2N2) virus" *Virology* 186:795-797.
- 65 Klimov A. y col. (1992b) "Subtype H7 influenza viruses: comparative antigenic and molecular analysis of the HA-, M-, and NS-genes" *Arch Virol.* 122:143-161.

- Kovacova, A. y col. (2002) "Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins" *Virus Genes* 24:57-63.
- Kuiken, T. y col. (2004) "Avian H5N1 influenza in cats" *Science* 306:241.
- 5 Kumar, S. y col. (2004) "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment" *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Lee, L.G. y col. (1993) "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes" *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-3766.
- Lewin, B. (1985) *Genes II*, John Wiley & Sons, Inc., p. 96.
- Lipatov, A.S. y col. (2004) "Influenza: emergence and control" *J Virol* 78:8951-8959.
- 10 Livak, K. J. y col. (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. y col. (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 y col., (2004) *Clin Microbiol.* 42(3):981-986.
- Merrifield, R.B. (1963) "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide" *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154.
- 20 Nikitin, A. y col. (1972) "Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs" *Bull World Health Organ* 47:471-479.
- Nobusawa, E. y col. (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. y col. (1984) "Lack of significant person-to person spread of swine influenzalike virus following fatal infection in an immunocompromised child" *Am J Epidemiol* 119:152-158.
- 25 Payungporn S. y col. (2006a) "Detection of canine influenza A virus (H3N8) RNA by realtime RT-PCR" (in preparation for *Journal of Clinical Microbiology*).
- Payungporn S. y col. (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*).
- Peiris, M. y col. (1999) "Human infection with influenza H9N2" *Lancet* 354:916-917.
- 30 Peiris, J.S. y col. (2004) "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease" *Lancet* 363:617-619.
- Posnett, D. N. y col. (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*.
- 35 Reid, A.H. y col. (2004) "Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus" *Nat Rev Microbiol* 2:909-914.
- Rowe, T. y col. (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.
- 40 Sambrook, J. y col. (1989) "Plasmid Vectors" In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, pp. 1.82-1.104. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Subbarao, K. y col. (1998) "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness" *Science* 279:393-396.
- 45 Suzuki, Y. y col. (2000) "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses" *J Virol* 74:11825-11831.
- Tam, J. P. (1988) "Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System" *PNAS USA* 85(15):5409-5413.
- Top, Jr., F.H. y col. (1977) "Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). IV. Summary and speculation" *J Infect Dis* 136 Suppl:S376-S380.
- 50 Vines, A. y col. (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. y col. (2002) "N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication" *J Gen Virol* 83:601-609.
- 55 Webby, R. y col. (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.
- Webster, R.G. y col. (1992) "Evolution and ecology of influenza A viruses" *Microbiol Rev.* 56 :152-179.
- Weis, W. y col. (1988) "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid" *Nature* 333:426-431.
- 60 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. y col. (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.
- 65 Yang, T. T. y col. (1996) "Optimized Codon Usage and Chromophore Mutations Provide Enhanced Sensitivity with the Green Fluorescent Protein" *Nucleic Acid Research* 24(22):4592-4593.
- Yoon K-Y. y col. (2005) "Influenza virus infection in racing greyhounds" *Emerg Infect Dis.* 11:1974-1975.



LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> University of Florida Research Foundation, Inc. et al.	
5	<120> Materiales y métodos para el control de la enfermedad respiratoria en caninos	
	<130> P/60826.EP02/MAR	
	<150> EP 06826359.9	
10	<151> 19-10-2006	
	<150> PCT/US2006/041061	
	<151> 19-10-2006	
15	<150> US 11/409.416	
	<151> 21-04-2006	
	<150> US 60/728.449	
20	<151> 19-10-2005	
	<150> US 60/754,881	
	<151> 29-12-2005	
	<150> US 60/759.162	
25	<151> 14-01-2006	
	<150> US 60/761.451	
	<151> 23-01-2006	
30	<150> US 60/779.080	
	<151> 03-03-2006	
	<160> 88	
35	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 2277	
	<212> ADN	
40	<213> Virus de la influenza	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(2277)	
45	<400> 1	
	atg gag aga ata gaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc	48
	Met Glu Arg Ile Glu 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 gaa aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa	144
	Lys Tyr Thr Ser Glu 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 ggt 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	

ES 2 496 315 T3

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	
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	
act 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 ata att	528
Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Ile 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	

ES 2 496 315 T3

	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 aaa aag gca acc aga aga ttg att caa ttg							1152
Arg Ala Thr Ala Ile Ile Lys 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 tct 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 cac aat							1344
Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe His 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 tct tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca							1632
Ile Ile Tyr Ser Ser Ser 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 gct							1872

ES 2 496 315 T3

```

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

ggc 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
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                                         2277
Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
                               755

```

<210> 2  
 <211> 759  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
  
 <400> 2

5

```

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

```

10

ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

```

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
- 5 <212> ADN
- <213> Virus de la influenza
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1)..(2274)
- <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

```

ES 2 496 315 T3

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	
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 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



# ES 2 496 315 T3

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 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									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						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	
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	

ES 2 496 315 T3

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 influenza  
 <400> 4

5

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

10

ES 2 496 315 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

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

ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

```

        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

```

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

5

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

10

<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

```

ES 2 496 315 T3

Ser 65	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala 70	Leu	Leu	Lys	His	Arg 75	Phe	Glu	Ile	Ile	Glu 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	ggt	gaa	att	ggg	gtg	aca	agg	aga	gaa	ggt	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		
					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		
					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		
					310				315						320		
agt	att	ggt	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			

ES 2 496 315 T3

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	

ES 2 496 315 T3

```

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

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 influenza  
 <400> 6

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

```

10



ES 2 496 315 T3

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 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 Ala

ES 2 496 315 T3

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															
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 2 496 315 T3

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  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

<220>  
 <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
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	

ES 2 496 315 T3

```

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> 8  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

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

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

```

10

ES 2 496 315 T3

```

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> 9  
 <211> 1497  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

<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

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

```

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

```

aat cta ccc 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
Asp Ser
                                                                1497

```

<210> 10  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
  
 <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

```

10

ES 2 496 315 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 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



ES 2 496 315 T3

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

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

<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

ES 2 496 315 T3

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 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

ES 2 496 315 T3

```

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 influenza

5

<400> 12

```

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
                               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

```

10

ES 2 496 315 T3

Gly Thr Val 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 Val 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

ES 2 496 315 T3

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 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> 13  
 <211> 982  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

<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	
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	

ES 2 496 315 T3

```

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 etc 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

gttattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt      826

ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa      886

ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt      946

gacgatggtc atttgtcaa catagagctg gagtaa      982

```

<210> 14  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
  
 <400> 14

5

```

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

```

10

ES 2 496 315 T3

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

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 influenza

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

<400> 15

atg aag aca acc 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 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

ES 2 496 315 T3

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 gct 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 tgc 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



ES 2 496 315 T3

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	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 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	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	560
tgc aac att tgc att tga			1698
Cys Asn Ile Cys Ile	565		

<210> 16  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
 <400> 16

5

ES 2 496 315 T3

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 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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

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 influenza

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2277)

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (731)..(731)  
 <223> El 'Xaa' la localización 731 se refiere a 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	
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

ES 2 496 315 T3

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
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 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

ES 2 496 315 T3

caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc caa aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln 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
cct 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 515 520 525	1584
ata att tat tcg tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser 530 535 540	1632
gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc agg aac tgg gaa att gta Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val 545 550 555 560	1680
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu 565 570 575	1728
ttt gag cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr 580 585 590	1776
agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly 595 600 605	1824
aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala 610 615 620	1872
cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val 625 630 635 640	1920
aga ggt tcg gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe 645 650 655	1968
aac tac aat aaa gcc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala 660 665 670	2016
ggt gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gaa tct Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser 675 680 685	2064
gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gaa aac aag aga tat Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr 690 695 700	2112

ES 2 496 315 T3

```

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 influenza
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (731)..(731)
- <223> El 'Xaa' la localización 731 se refiere a 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

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

```

15

ES 2 496 315 T3

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		
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		



ES 2 496 315 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 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

ES 2 496 315 T3

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

<210> 19  
<211> 2274  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

5

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

10

<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	

ES 2 496 315 T3

aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg act tcc aat gaa tcg Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser 145 150 155 160	480
ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys 165 170 175	528
gaa gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg 180 185 190	576
gac aac atg aca aag aga atg gta aca cag aga acc ata ggg aag aaa Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys 195 200 205	624
aaa caa cga tta aac aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu 210 215 220	672
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala 225 230 235 240	720
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga ggg ttt gta tat ttt gtt gaa Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu 245 250 255	768
aca cta gcc cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro 260 265 270	816
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys 275 280 285	864
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly 290 295 300	912
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala 305 310 315 320	960
atg atc aca tac ata act aga aac cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val 325 330 335	1008
cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly 340 345 350	1056
aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile 355 360 365	1104
cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser 370 375 380	1152
aca aaa aag aaa att gaa aag ata cga cca ctt ctg gtt gac ggg act Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr 385 390 395 400	1200
gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser	1248

ES 2 496 315 T3

			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	
					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	
					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	
					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	ggt	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

ES 2 496 315 T3

```

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 influenza  
  
 <400> 20

5

```

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

```

10

ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

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  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

5

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

10

<400> 21

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	



ES 2 496 315 T3

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
ggt cca ccc tgc cat cag cga tct aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg			864
Gly 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

ES 2 496 315 T3

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 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 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	
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	

ES 2 496 315 T3

```

agg 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 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 influenza  
 <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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

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

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  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

<220>  
<221> CDS

ES 2 496 315 T3

<222> (1)..(657)

<400> 23

5

```

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
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

ES 2 496 315 T3

<212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

<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

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 influenza

10

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

15

<400> 25

ES 2 496 315 T3

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	



ES 2 496 315 T3

210	215	220	
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp 225	230	235	720 240
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu 245	250	255	768
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His 260	265	270	816
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca gta acc agt ggg Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val 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	960 320
aac cca gca cac aag 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 gac 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 gat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa Glu Asn Met Glu Thr Ile Asp Ser Ser Thr Leu 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	1200 400
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 ggg 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	1440 480
atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt			1488

ES 2 496 315 T3

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

5

- <210> 26
- <211> 498
- <212> PRT
- <213> Virus de la influenza
- <400> 26

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

10

ES 2 496 315 T3

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

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 2 496 315 T3

<210> 27  
 <211> 1410  
 <212> ADN  
 5 <213> Virus de la influenza

<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
Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly
                               180                              185                              190
    
```

ES 2 496 315 T3

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				
ggt	ccg	ggt	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	ggt	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
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	

ES 2 496 315 T3

450 455 460 1410  
 ttt gac atc gat aag atg  
 Phe Asp Ile Asp Lys Met  
 465 470

5

- <210> 28
- <211> 470
- <212> PRT
- <213> Virus de la influenza
- <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  
 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

10

ES 2 496 315 T3

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			
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> 29  
 <211> 982  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

ES 2 496 315 T3

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

5 <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	
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	



ES 2 496 315 T3

```

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

gttattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgctct      826

ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa      886

ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt      946

gacgatggtc attttgtaa catagagctg gagtaa                               982

```

<210> 30  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
 <400> 30

5

```

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

```

10

ES 2 496 315 T3

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 influenza

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

<400> 31

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 tgc 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	

ES 2 496 315 T3

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 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	

ES 2 496 315 T3

	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 influenza

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

10

ES 2 496 315 T3

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	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	

ES 2 496 315 T3

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

5

- <210> 33
- <211> 549
- <212> PRT
- <213> Virus de la influenza
- <400> 33

ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

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

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



ES 2 496 315 T3

<210> 34  
 <211> 549  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

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  
 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

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

ES 2 496 315 T3

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 Val 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

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

ES 2 496 315 T3

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 Lys Gly Asn Ile Arg  
530 535 540

Cys Asn Ile Cys Ile  
545

5 <210> 35  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

10 <400> 35  
gagagtgg 9

15 <210> 36  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

20 <400> 36  
ccgttggtc 9

25 <210> 37  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

30 <400> 37  
caaaccaga 9

35 <210> 38  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

40 <400> 38  
agaactggg 9

45 <210> 39  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

50 <400> 39  
tatgagagt gggac 15

55 <210> 40  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

60 <400> 40  
agaccgttg tcaga 15

<210> 41

<211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

5      <400> 41  
          aagcaaacca gagga            15

<210> 42  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

10

<400> 42  
 ataagaactg ggaca            15

15

<210> 43  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

20

<400> 43  
 acaatgagt            9

25

<210> 44  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

30

<400> 44  
 aaaacaatga gtgat            15

<210> 45  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

35

<400> 45  
 gatgtaccc            9

40

<210> 46  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

45

<400> 46  
 tcagatgtac ccata            15

<210> 47  
 <211> 2280  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

50

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2280)

55

<400> 47

ES 2 496 315 T3

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 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	

ES 2 496 315 T3

caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gca aca gta Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260 265 270	816
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275 280 285	864
att ggt gga aca agg atg gta gac atc ctt aag cag aac cca aca gag Ile Gly Gly Thr 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 agg 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 aga aag gca acc aga aga ttg att caa ttg Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg 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 caa aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln 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
cct 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 2 496 315 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 aga 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 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	
ggg 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> 48  
 <211> 759  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

5

<400> 48

ES 2 496 315 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

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



ES 2 496 315 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 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

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

ES 2 496 315 T3

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 influenza

5

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

10

<400> 49

ES 2 496 315 T3

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	

ES 2 496 315 T3

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 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	ggt 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	

ES 2 496 315 T3

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 egg	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 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	2274
Leu Arg Arg Gln Lys	
755	

<210> 50  
 <211> 757  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
  
 <400> 50

5

ES 2 496 315 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

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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

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> 51  
 <211> 2151  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

5

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

10

<400> 51



ES 2 496 315 T3

atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu 1 5 10 15	48
gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr 20 25 30	96
aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr 35 40 45	144
tcg gat ttc cac ttt ata aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu 50 55 60	192
tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu 65 70 75 80	240
ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn 85 90 95	288
acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr 100 105 110	336
aaa gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His 115 120 125	384
ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His 130 135 140	432
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 ggc 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 ggc 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	768

ES 2 496 315 T3

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	
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	

ES 2 496 315 T3

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 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 influenza

<400> 52

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

5

10

ES 2 496 315 T3

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  
 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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

				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		
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 influenza

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 2 496 315 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 influenza  
 <400> 54

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		

5

10

ES 2 496 315 T3

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

5 <210> 55  
 <211> 1497  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

10 <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



ES 2 496 315 T3

20	25	30	
gtg gga gga atc gga cgg ttt tat gtc cag atg tgt act gag ctt aaa Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys 35 40 45			144
cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu 50 55 60			192
agg atg gtg ctt tcg gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu 65 70 75 80			240
gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile 85 90 95			288
tac aga aga aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp 100 105 110			336
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac Lys Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp 115 120 125			384
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn 130 135 140			432
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp 145 150 155 160			480
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser 165 170 175			528
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggc gtt gga aca atg gta atg gaa Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu 180 185 190			576
ctc atc aga atg atc aag cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg 195 200 205			624
ggt gaa aat ggt cga aga acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn 210 215 220			672
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp 225 230 235 240			720
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu 245 250 255			768
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His 260 265 270			816
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca gta acc agt ggg Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly 275 280 285			864
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc			912

ES 2 496 315 T3

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					
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> 56  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

<400> 56

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

ES 2 496 315 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

ES 2 496 315 T3

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  
 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
- 5 <212> ADN
- <213> Virus de la influenza
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(1413)
- <400> 57

ES 2 496 315 T3

atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly 1 5 10 15	48
ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr 20 25 30	96
gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr 35 40 45	144
atc ata aga gaa tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa ctt act caa Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Leu Thr Gln 50 55 60	192
tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu 65 70 75 80	240
tac tac atg aat aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala 85 90 95	288
cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val 100 105 110	336
ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg 115 120 125	384
acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn 130 135 140	432
ggc aca ata aag gat cga agt ccg tat agg act ttg atg agt gtc aaa Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys 145 150 155 160	480
ata ggg caa tca cct aat gta tat caa gct agg ttt gaa tcg gtg gca Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala 165 170 175	528
tgg tca gca aca gca tgc cat gat gga aaa aaa tgg atg aca gtt gga Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly 180 185 190	576
gtc aca ggg ccc gac aat caa gca att gca gta gtg aac tat gga ggt Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly 195 200 205	624
gtt ccg gtt gat att att aat tca tgg gca ggg gat att tta aga acc Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr 210 215 220	672
caa gaa tca tca tgc acc tgc att aaa gga gac tgt tat tgg gta atg Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met 225 230 235 240	720
act gat gga ccg gca aat agg caa gct aaa tat agg ata ttc aaa gca Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala 245 250 255	768
aaa gat gga aga gta att gga caa act gat ata agt ttc aat ggg gga Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly	816

ES 2 496 315 T3

	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		
	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> 58  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

5

<400> 58

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

10

ES 2 496 315 T3

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		
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		
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		

ES 2 496 315 T3

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

5 <210> 59  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

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

<400> 59

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



ES 2 496 315 T3

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  
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

ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa 886

ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt 946

gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagta 981

<210> 60  
<211> 252  
<212> PRT  
<213> Virus de la influenza  
<400> 60

ES 2 496 315 T3

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

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

- 5
- <210> 61
  - <211> 1698
  - <212> ADN
  - <213> Virus de la influenza
  - <220>

ES 2 496 315 T3

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

<400> 61

5

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 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	

ES 2 496 315 T3

210	215	220	
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tct aga ccg ttg gtc aga ggt Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly 225 230 235 240			720
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp 245 250 255			768
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr 260 265 270			816
ttt aaa ttg aac aca ggg aaa agc tct gta atg aga tcc gat gta ccc Phe Lys Leu Asn Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro 275 280 285			864
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser 290 295 300			912
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys 305 310 315 320			960
ccc aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg 325 330 335			1008
aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly 340 345 350			1056
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe 355 360 365			1104
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser 370 375 380			1152
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile 385 390 395 400			1200
gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu 405 410 415			1248
gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys 420 425 430			1296
ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn 435 440 445			1344
caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu 450 455 460			1392
aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly 465 470 475 480			1440
tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gaa tca ata			1488

ES 2 496 315 T3

```

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

```

5

<210> 62  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
 <400> 62

```

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

```

10

ES 2 496 315 T3

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 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

ES 2 496 315 T3

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  
 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 influenza

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (2280)

<400> 63

5  
 10

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 2 496 315 T3

gag atg att cct gag aga aat gaa cag gga caa acc ctt tgg agc aaa Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys 65 70 75 80	240
acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val 85 90 95	288
aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg aac aca att cat tat cca Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Asn Thr Ile His Tyr Pro 100 105 110	336
aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly 115 120 125	384
acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg 130 135 140	432
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac cfc agt gct aaa gaa gca caa Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln 145 150 155 160	480
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc aga att Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile 165 170 175	528
cta aca tca gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu 180 185 190	576
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu 195 200 205	624
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gta ggc gga aca Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr 210 215 220	672
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp 225 230 235 240	720
gag caa atg tac acc cca gga gga aaa gtt aga aac gat gat att gat Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp 245 250 255	768
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gca aca gta Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260 265 270	816
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275 280 285	864
att ggt gga aca agg atg gta gac atc ctt aag cag aac cca aca gag Ile Gly Gly Thr 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 agg aca agt gga tca Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser	1008



ES 2 496 315 T3

	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 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 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

ES 2 496 315 T3

```

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

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

ggg 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

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 influenza

5

<400> 64

```

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

```

10

ES 2 496 315 T3

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  
 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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

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> 65  
 <211> 2274  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

5

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

10

<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

ES 2 496 315 T3

50	55	60	
caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser 65 70 75 80			240
ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu 85 90 95			288
gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu 100 105 110			336
gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Arg Gln Thr 115 120 125			384
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala 130 135 140			432
aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg acc tcc aat gaa tcg Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser 145 150 155 160			480
ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys 165 170 175			528
gag gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg 180 185 190			576
gac aac atg aca aag aga atg ata aca cag aga acc ata gga aag aaa Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys 195 200 205			624
aaa caa cga tta agc aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta Lys Gln Arg Leu Ser Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu 210 215 220			672
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala 225 230 235 240			720
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga gga ttt gta tat ttt gtt gaa Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu 245 250 255			768
aca cta gct cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro 260 265 270			816
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys 275 280 285			864
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly 290 295 300			912
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala 305 310 315 320			960
atg atc aca tac ata act aga gat cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt			1008

ES 2 496 315 T3

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	ggt	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	ggt	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			

ES 2 496 315 T3

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 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 2274  
 Leu Arg Arg Gln Lys  
 755

<210> 66  
 <211> 757  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

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  
 50 55 60

10



ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

```

                    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  
 <213> Virus de la influenza

5

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

10

<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

```

ES 2 496 315 T3

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	ggt	gaa	att	ggt	gtg	aca	agg	aga	gaa	ggt	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		
		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		

ES 2 496 315 T3

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	
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	

ES 2 496 315 T3

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

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> 68  
 <211> 716  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
 <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

10

ES 2 496 315 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





ES 2 496 315 T3

```

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> 69  
 <211> 844  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (690)

10

<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

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
    
```

ES 2 496 315 T3

```

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> 70  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
  
 <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
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

```

10

ES 2 496 315 T3

```

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

```

5 <210> 71  
 <211> 1497  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la influenza

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

<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
                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

```

ES 2 496 315 T3

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		
			260				265						270				
aaa	tca	tgc	cta	cct	gcc	tgt	gtt	tat	ggc	ctt	gca	cta	acc	agt	ggg		864
Lys	Ser	Cys	Leu	Pro	Ala	Cys	Val	Tyr	Gly	Leu	Ala	Leu	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					

ES 2 496 315 T3

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

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 ttc 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> 72  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza  
 <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

10

ES 2 496 315 T3

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

ES 2 496 315 T3

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

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 influenza

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

<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	

ES 2 496 315 T3

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



ES 2 496 315 T3

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> 74  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

<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

5

10

ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

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 influenza

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

<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

ES 2 496 315 T3

```

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                      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

ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa      886

ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt      946

gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagta      981

```

<210> 76  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza

<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

```

5

10

ES 2 496 315 T3

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> 77  
<211> 1698  
5 <212> ADN  
<213> Virus de la influenza

<220>  
10 <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 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

ES 2 496 315 T3

	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 tcc 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
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

ES 2 496 315 T3

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			310		315		320	
305								
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	
325								
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	
340								
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					360		365	
355								
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					375		380	
370								
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					390		395	400
385								
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	
405								
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	
420								
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					440		445	
435								
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					455		460	
450								
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					470		475	480
465								
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
485								
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		510	
500								
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					520		525	
515								
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					535		540	
530								
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					550		555	560
545								
tgc aac att tgc att tga								1698
Cys Asn Ile Cys Ile					565			
565								

ES 2 496 315 T3

<210> 78  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 5 <213> Virus de la influenza  
 <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  
 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



ES 2 496 315 T3

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

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

ES 2 496 315 T3

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

5 <210> 79  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

10 <400> 79  
tatgcatcgc tccgatccat 20

15 <210> 80  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

20 <400> 80  
gctccacttc ttccgttttg a 21

25 <210> 81  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

30 <400> 81  
aattcacagc agagggattc acatggacag 30

35 <210> 82  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Virus de la influenza

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 influenza

55 <220>  
<221> variación  
<222> (18)..(18)  
<223> k = g o t

ES 2 496 315 T3

	<400> 83 agggcatttt ggacaaakcg tcta	24
5	<210> 84 <211> 18 <212> ADN <213> Virus de la influenza	
10	<400> 84 acgctcaccg tgcccagt	18
15	<210> 85 <211> 28 <212> ADN <213> Virus de la influenza	
20	<400> 85 tattcgtctc agggagcaaa agcagggg	28
25	<210> 86 <211> 42 <212> ADN <213> Virus de la influenza	
30	<400> 86 tgtaatacga ctactatag ggctccactt cttccgtttt ga	42
35	<210> 87 <211> 30 <212> ADN <213> Virus de la influenza	
40	<400> 87 gatcgtcttt caggagcaa aagcaggtag	30
	<210> 88 <211> 40 <212> ADN <213> Virus de la influenza	
	<400> 88 tgtaatacga ctactatag ggcattttgg acaaagcgtc	40

## REIVINDICACIONES

1. Un virus de influenza canina aislado que es capaz de infectar un animal cánido, donde dicho virus de la influenza comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido hemaglutinina (HA) que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 62; o una secuencia madura de la misma donde la secuencia de señal de 16 aminoácidos del extremo N se ha retirado de la secuencia de longitud completa.
2. El virus de influenza de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho virus de influenza comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 95% o mayor con la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60.
3. El virus de influenza de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polipéptido HA de dicho aislado vírico comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 62.
4. El virus de influenza de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho virus de influenza comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, o 61, o dicho polinucleótido tiene una identidad de secuencia del 98% o mayor con la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, o 61.
5. El virus de influenza de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho virus de influenza está inactivado o atenuado.
6. Una composición que comprende un inmunógeno de un virus de influenza de la reivindicación 1, donde dicho inmunógeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de influenza que es capaz de infectar un animal cánido, y donde dicho inmunógeno comprende:
- (a) un polipéptido HA como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 3; y/o
  - (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido HA como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 3.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho inmunógeno comprende virus completo libre de células, o una parte del mismo; un polinucleótido vírico; una proteína vírica; un polipéptido o péptido vírico; una célula infectada por el virus; una construcción basada en un vector vírico recombinante; un virus combinado; o un ácido nucleico desnudo de dicho virus.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicha proteína vírica, polipéptido o péptido comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 95% o mayor con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o donde dicho polinucleótido vírico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o un fragmento funcional y/o inmunogénico de la misma, o dicho polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 95% o mayor con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 48, 50, 52, 54, 56, 58, o 60, o donde dicho polinucleótido vírico comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°s 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, o 61, o un fragmento funcional de la misma.
9. Una vacuna de influenza canina, donde la vacuna comprende:
- una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno de al menos un virus de influenza de la reivindicación 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde dicho antígeno comprende:
  - (a) un polipéptido HA como se define en la reivindicación 1 o reivindicación 3; y/o
  - (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 3.
10. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, donde el antígeno vírico comprende un virus inactivado o un virus vivo atenuado.
11. Un polinucleótido aislado que comprende todo o parte de un segmento genómico o gen de un virus de influenza de la reivindicación 1, donde el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido HA como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 3.
12. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho polinucleótido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. Una construcción de polinucleótido de expresión que comprende un polinucleótido de la reivindicación 11.
14. Un polipéptido HA aislado codificado por un polinucleótido de la reivindicación 11.
- 5 15. El polipéptido de la reivindicación 14, donde dicho polipéptido se formula en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

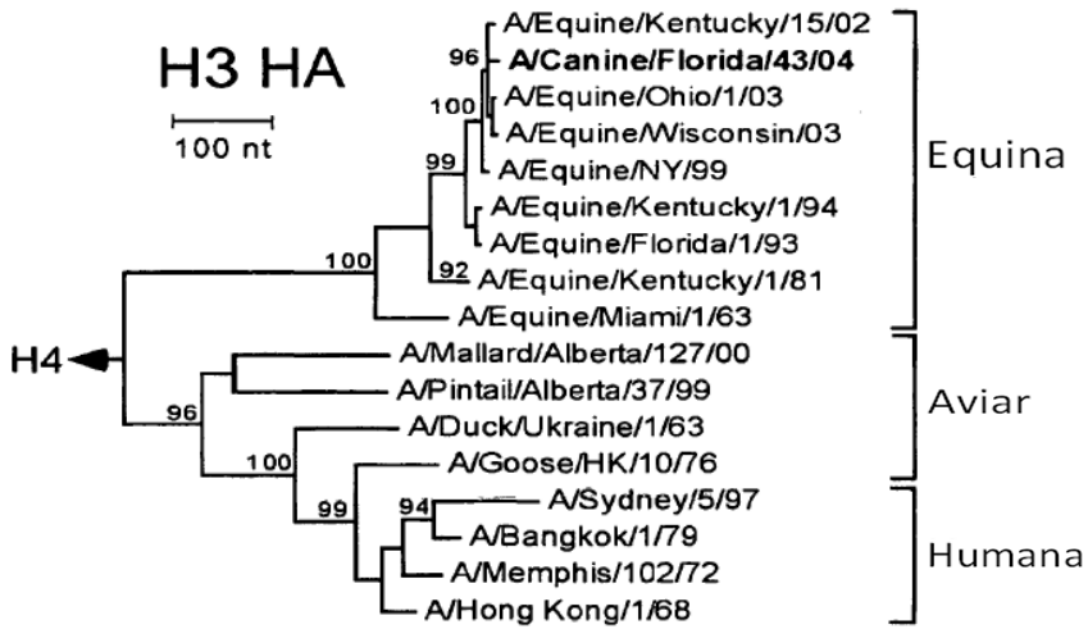


FIG. 1A

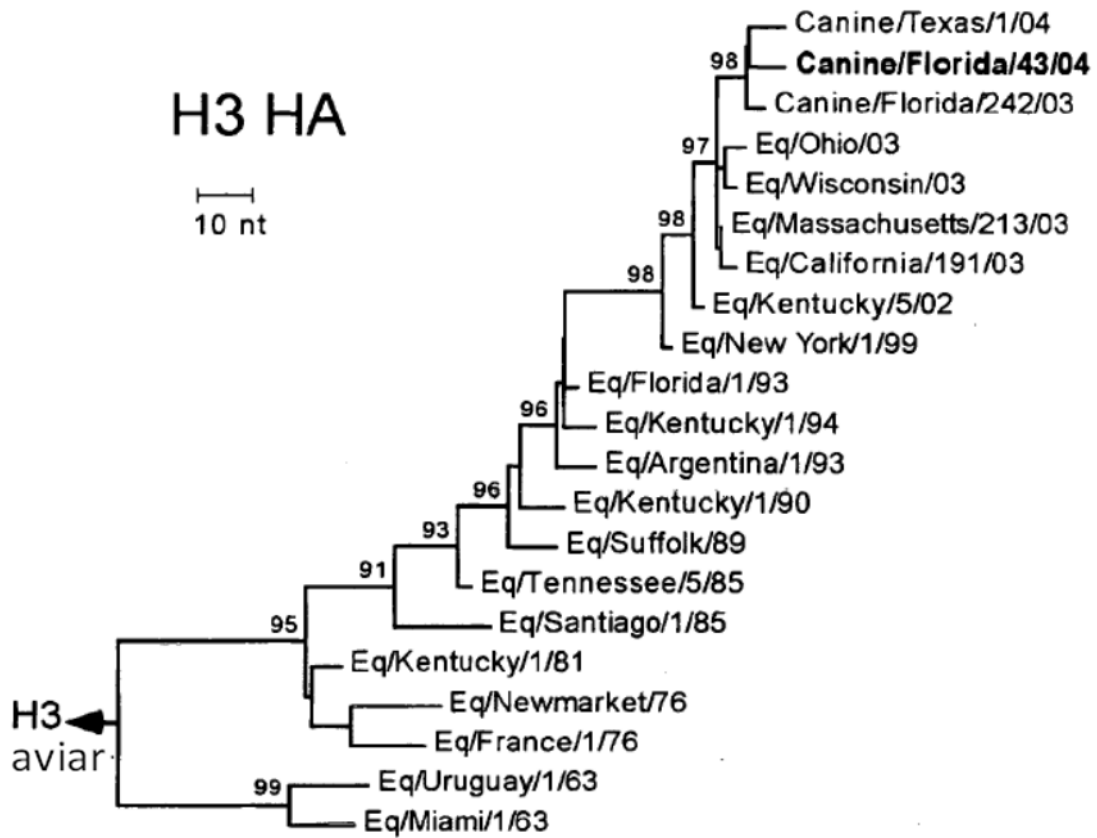


FIG. 1B

FIG. 2A



FIG. 2B

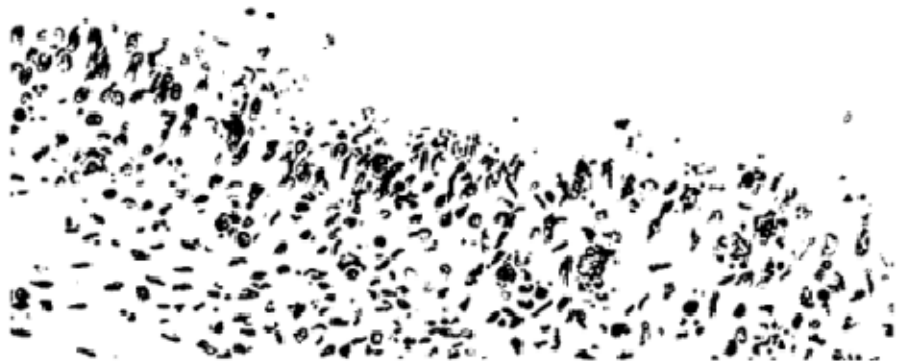






FIG. 3A

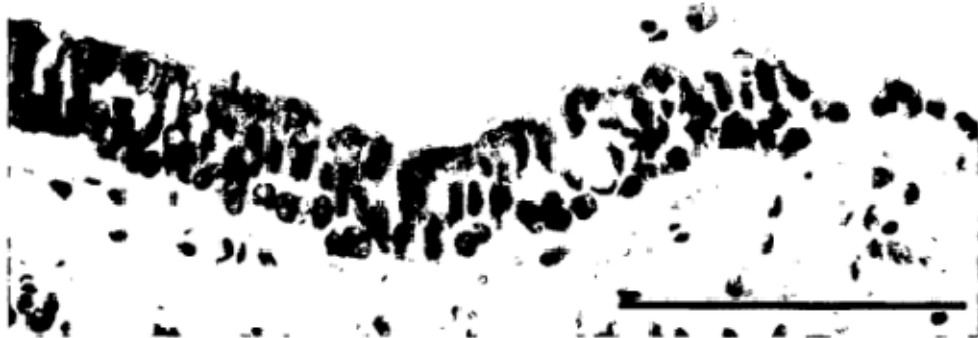


FIG. 3B

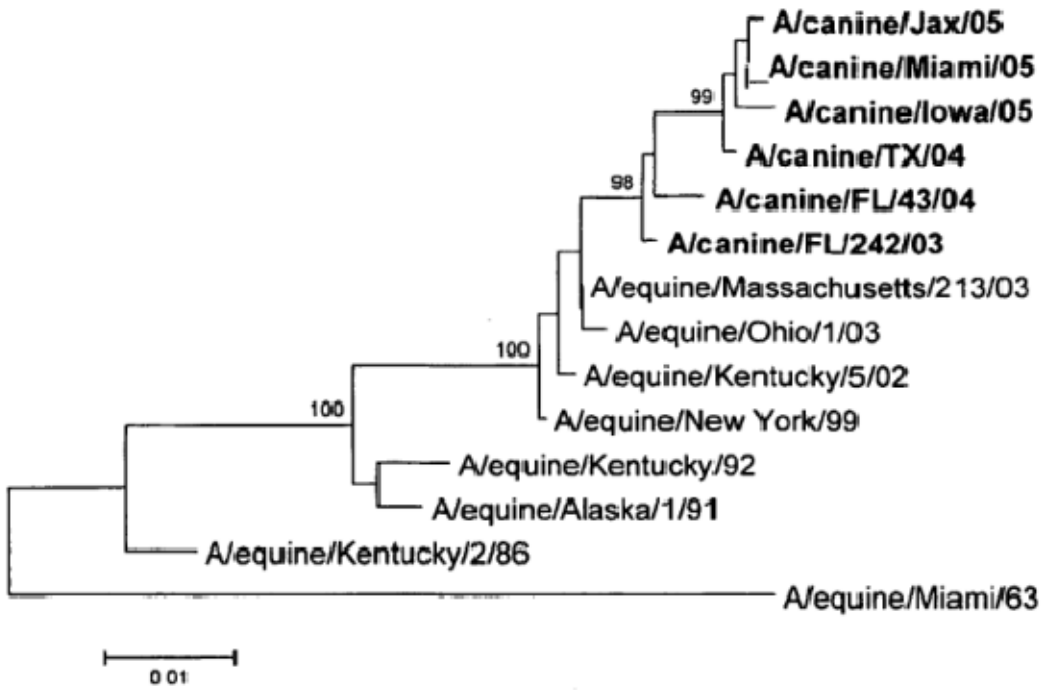


FIG. 4A

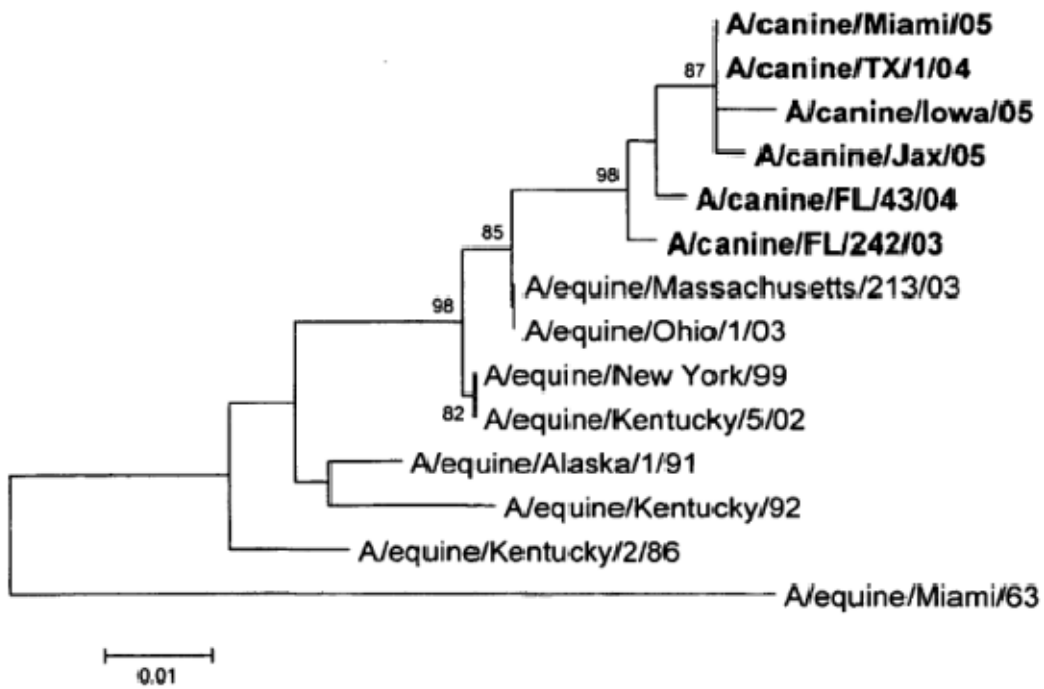


FIG. 4B

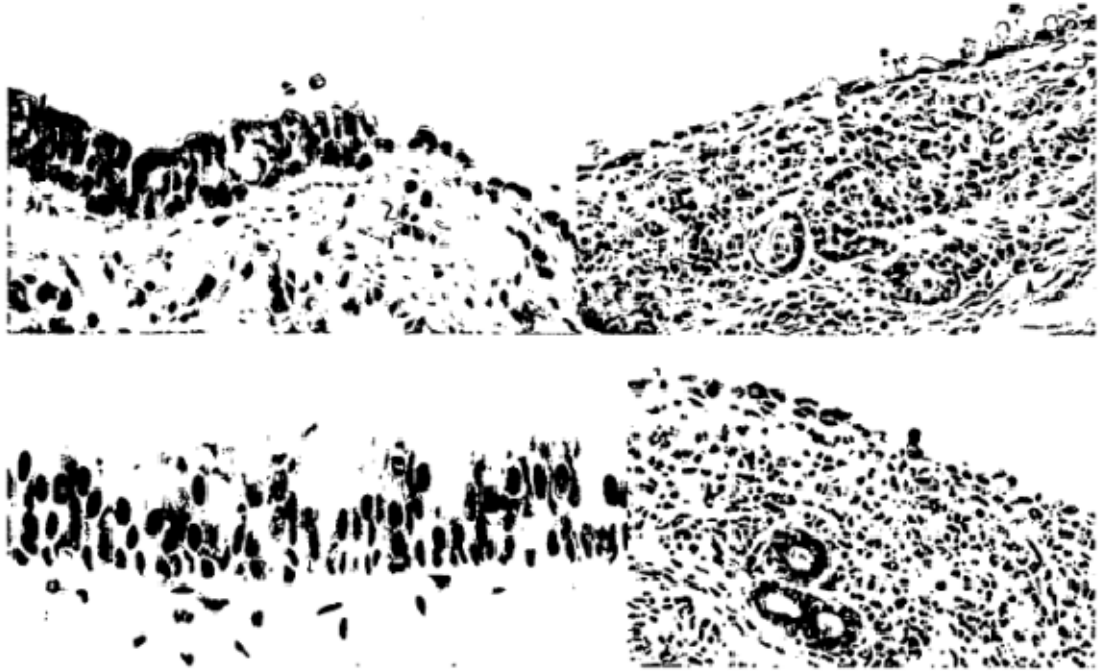


FIG. 5

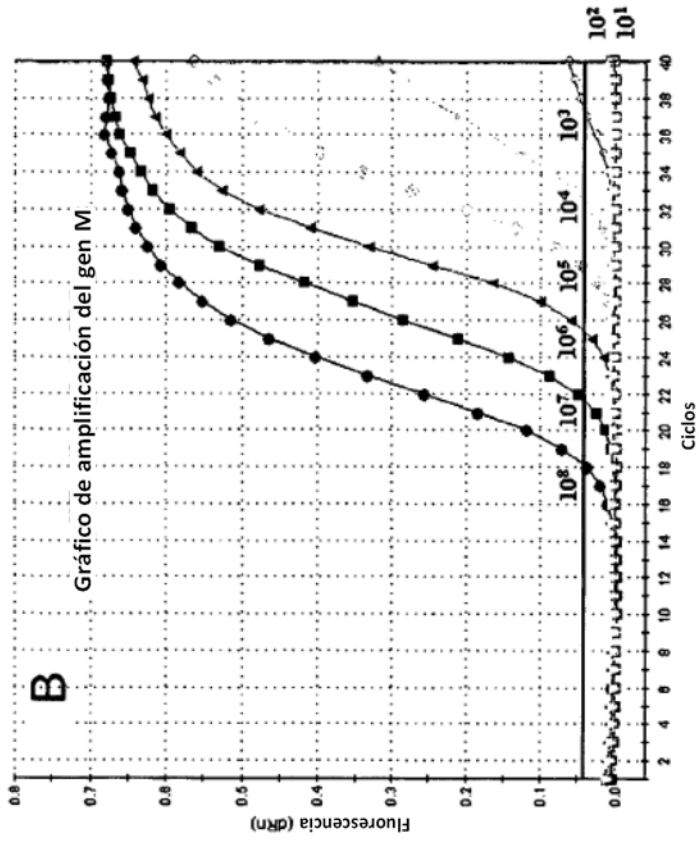


FIG. 6B

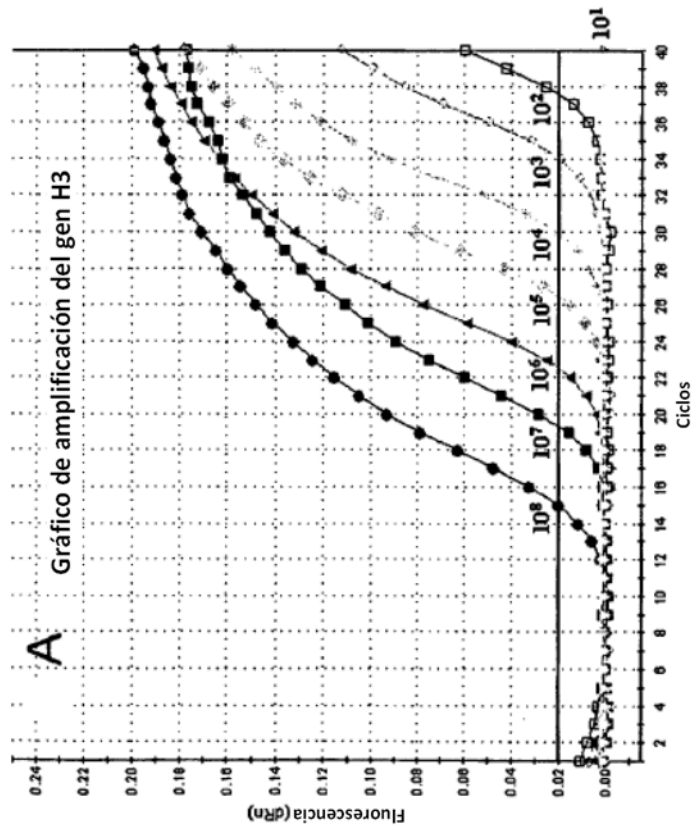


FIG. 6A

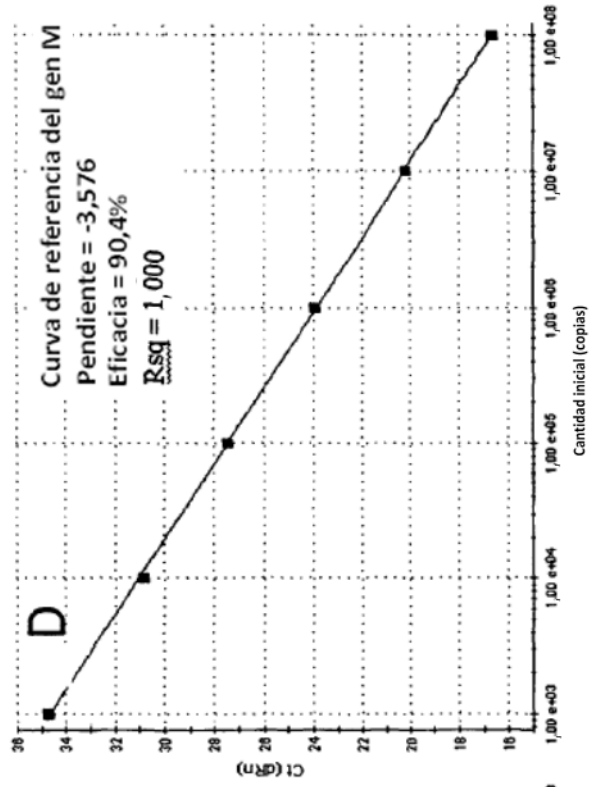


FIG. 6D

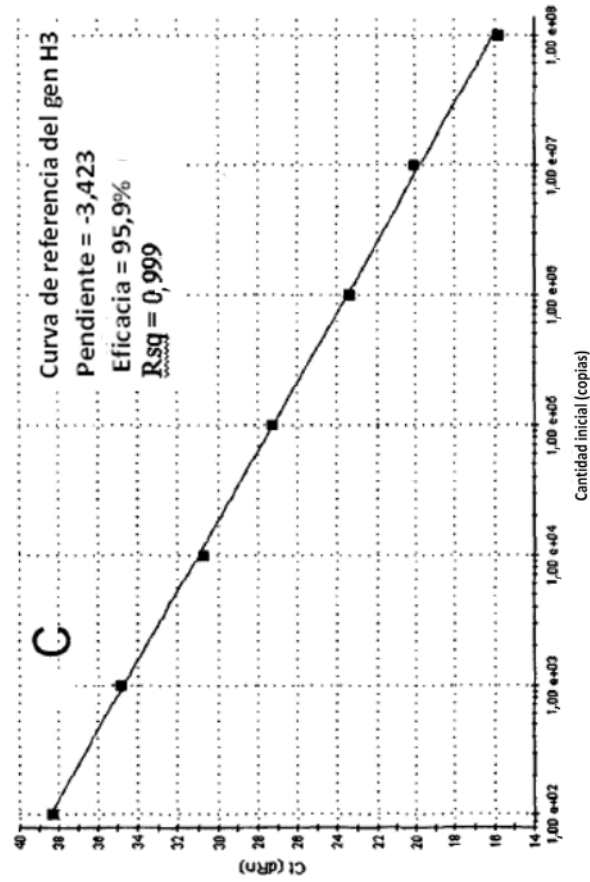


FIG. 6C

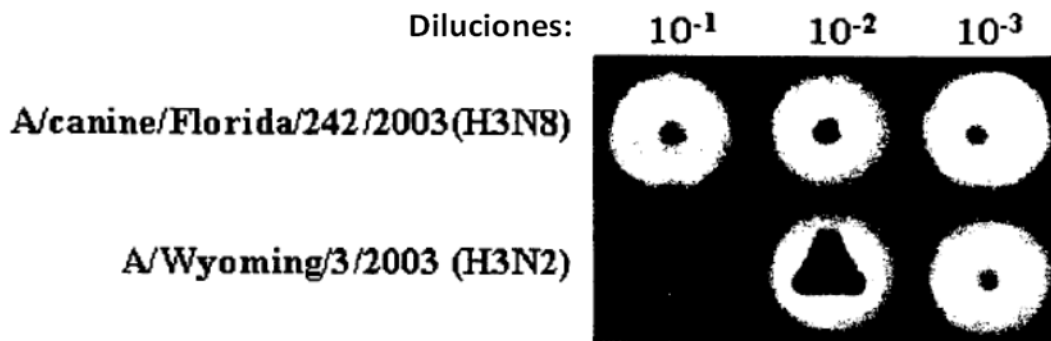


FIG. 7