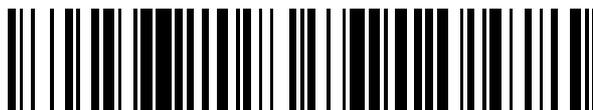


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 361**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10794834 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2448596**

54 Título: **Composiciones y métodos para diagnosticar y/o tratar una infección gripal**

30 Prioridad:

02.07.2009 US 222889 P

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

12.04.2016

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139-4307, US**

72 Inventor/es:

**JAYARAMAN, AKILA;
VISWANATHAN, KARTHIK;
RAMAN, RAHUL;
SHRIVER, ZACHARY, H. y
SASISEKHARAN, RAM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 566 361 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

Composiciones y métodos para diagnosticar y/o tratar una infección gripal

5 Antecedentes de la invención

El 11 de junio de 2009 la Organización Mundial de la Salud elevó el nivel de alerta pandémica global a la fase 6, la fase pandémica, en respuesta a la aparición y propagación global de un nuevo virus de la gripe A (H1N1) denominado en lo sucesivo virus A/H1N1 2009 que contiene una combinación única de genes de origen porcino (Garten *et al.*, "Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans" Science, May 22, 2009, Science Express Online; incorporado en el presente documento por referencia). La aparición de esta nueva cepa puede remontarse a marzo-abril de 2009 cuando hubo informes de un mayor número de pacientes con enfermedades parecidas a la gripe y hospitalizaciones y muertes asociadas en varias áreas de Méjico. En el periodo de marzo-19 de junio de 2009, se confirmaron en laboratorio más de 44.000 casos humanos de infecciones gripales por A/H1N1 2009 notificadas en 85 países en los 6 continentes.

Dado el rápido brote de este virus, ha habido ciertas incertidumbres asociadas con su virulencia, transmisibilidad y sus orígenes. Ciertos estudios recientes que usan modelos epidemiológicos para interpretar datos sobre brotes del virus H1N1 2009 han indicado que su transmisibilidad está en el extremo inferior de lo que se estimaba para el H1N1 1918 pandémico. En la mayoría de los casos de infección humana con los virus H1N1 2009, los síntomas han sido relativamente leves, sin embargo, se han notificado más de 150 muertes. Además, una parte significativa (~40 %) de los individuos infectados experimentan trastornos gastrointestinales y vómitos, un porcentaje que es superior al que se observaría típicamente en el caso de la gripe estacional.

25 Sumario de la Invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la infección con un virus de la gripe H1N1. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de una infección con un virus de la gripe H1N1 que ha adquirido una infectividad humana significativa.

Entre otras cosas, la presente invención define variantes HA de H1N1 con mayor unión y/o infectividad en humanos en comparación con las cepas de la gripe H1N1. Estas variantes pueden utilizarse, entre otras cosas, como componentes de vacunas y/o agentes terapéuticos para tratar, reducir y/o prevenir la infección humana por virus H1N1, y particularmente por una variante con mayor unión y/o infectividad en humanos. Como alternativa o adicionalmente, dichas variantes pueden utilizarse como patrones en sistemas para detectar la aparición y/o la infección con una variante de H1N1 con mayor infectividad humana.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona agentes que se unen específicamente a un polipéptido HA de H1N1, por ejemplo para usarse en la detección de una infección por H1N1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que se unen específicamente a una variante de H1N1 con mayor unión y/o infectividad humana. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que discriminan entre variantes de H1N1 con mayor infectividad humana y variantes de H1N1 con mayor infectividad humana.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona agentes que interfieren (y/o compiten) con interacciones de unión entre un polipéptido HA de H1N1 y uno o más glicanos, por ejemplo glicanos con topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que interfieren (y/o compiten con) interacciones de unión entre un polipéptido HA de H1N1 y uno o más glicanos α 2,6 sialilados. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que interfieren (y/o compiten) con interacciones de unión entre un polipéptido HA de H1N1 y uno o más glicanos 6'SLN-LN. En algunas realizaciones, el polipéptido HA de H1N1 cuya interacción de unión se ve afectada es una variante de H1N1 con mayor unión y/o infectividad en humanos.

Como ya se ha indicado, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas para realizar vigilancia para detectar la presencia y/o la infección con gripe H1N1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas para realizar vigilancia para detectar la presencia y/o la infección con una variante de la gripe H1N1 con mayor unión y/o infectividad en humanos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona estrategias para vacunar y/o tratar poblaciones (por ejemplo, poblaciones humanas) contra la infección con cepas de la gripe H1N1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona estrategias para vacunar y/o tratar poblaciones (por ejemplo, poblaciones humanas) contra la infección con una variante de la gripe H1N1 con mayor unión y/o infectividad en humanos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona estrategias para estratificar poblaciones de pacientes, por ejemplo, identificar sujetos previamente expuestos a uno o más virus que muestran similitud con A/H1N1 2009. De esta manera, es previsible que puedan identificarse poblaciones de pacientes que tienen un riesgo reducido o

aumentado de contraer el virus A/H1N1 2009 y/o potencialmente tener una respuesta inmune retardada debido a la falta de inmunidad humoral previa a uno o más virus que muestran similitud con A/H1N1 2009.

Breve Descripción de los Dibujos

5

Figura 1. Alineamiento de secuencias ejemplares de HA de tipo silvestre. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos de secuencias de virus de la gripe NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>). H1_Av (SEQ ID NO: 1). H1_Hu1 (SEQ ID NO: 2). H1_Hu2 (SEQ ID NO: 3). H2_Av (SEQ ID NO: 4). H2_Hu (SEQ ID NO: 5). H3_Av (SEQ ID NO: 6). H3_Hu1 (SEQ ID NO: 7). H3_Hu2 (SEQ ID NO: 8). H4_Av (SEQ ID NO: 9). H5_Av1 (SEQ ID NO: 10). H5_Av2 (SEQ ID NO: 11). H6_Av (SEQ ID NO: 12). H7_Av (SEQ ID NO: 13). H8_Av (SEQ ID NO: 14). H9_Av (SEQ ID NO: 15). H10_Av (SEQ ID NO: 16). H11_Av (SEQ ID NO: 17). H12_Av (SEQ ID NO: 18). H13_Av (SEQ ID NO: 19). H14_Av (SEQ ID NO: 20). H15_Av (SEQ ID NO: 21). H16_Av (SEQ ID NO: 22).

10

Figura 2. Alineamiento de secuencias del dominio de unión al glicano de HA. Gris: aminoácidos conservados implicados en la unión al ácido siálico. Rojo: aminoácidos particulares implicados en la unión a motivos Neu5Ac α 2-3/6Gal. Amarillo: aminoácidos que influyen en el posicionamiento de Q226 (137, 138) y E190 (186, 228). Verde: aminoácidos implicados en la unión a otros monosacáridos (o modificaciones) unidos al motivo Neu5Ac α 2-3/6Gal. La secuencia para ASI30, APR34, ADU63, ADS97 y Viet04 se obtuvieron a partir de sus estructuras cristalinas respectivas. Las otras secuencias se obtuvieron en SwissProt (<http://us.expasy.org>). Abreviaturas: ADA76, A/Duck/Alberta/35/76 (H1N1) (SEQ ID NO: 23); ASI30, A/Swine/Iowa/30 (H1N1) (SEQ ID NO: 24); APR34, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (SEQ ID NO: 25); ASC18, A/South Carolina/1/18 (H1N1) (SEQ ID NO: 26); AT91, A/Texas/36/91 (H1N1) (SEQ ID NO: 27); ANY18, A/New York/1/18 (H1N1) (SEQ ID NO: 28); ADU63, A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8) (SEQ ID NO: 29); AAI68, A/Aichi/2/68 (H3N2) (SEQ ID NO: 30); AM99, A/Moscow/10/99 (H3N2) (SEQ ID NO: 31); ADS97, A/Duck/Singapore/3/97 (H5N3) (SEQ ID NO: 32); Viet04, A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (SEQ ID NO: 33).

15

20

Figura 3. Alineamiento de secuencias que ilustra subsecuencias conservadas características de HA de H1. La Figura 3A presenta el mismo alineamiento que se presentó en la Figura 1A, con la excepción de que la Figura 3A indica la presencia de una subsecuencia conservada adicional. La Figura 3B presenta el mismo alineamiento que se presentó en la Figura 1C, con la excepción de que la Figura 3A indica la presencia de una subsecuencia conservada adicional.

25

Figura 4. (A) Alineamiento de secuencias de HA de A/H1N1 2009 (CA_04_09) y sus formas mutantes (Mut_1) y Mut_2) junto con HA adaptados humanos (SC_1_18, Solls_3_06, Bris_59_07). Los restos destacados en gris contribuyen directa o indirectamente a la unión α 2-6. Los restos mostrados en rojo son restos que están alterados en las variantes de H1N1 con mayor unión y/o infectividad humana en comparación con HA de A/H1N1 2009 (CA_04_09). CA_04_09 (SEQ ID NO: 34). CA_04_09_Mut1 (SEQ ID NO: 35). CA_04_09_Mut2 (SEQ ID NO: 36). SC_1_18 (SEQ ID NO: 37). Solls_3_06 (SEQ ID NO: 38). Bris_59_07 (SEQ ID NO: 39). (B) *Alineamiento de secuencias de HA de gripe H1N1 procedente de una cepa estacional de 2009 (Aichi_9_09), cepa estacional de 2007-2008 (Bris_59_07) y una cepa de "gripe porcina" (Cal_04_09).* AAichi_9_09 (SEQ ID NO: 40) = A/Aichi/9/2009; ABris_59_07 (SEQ ID NO: 41) = A/Brisbane/59/2007; ACal_04_09 (SEQ ID NO: 42) = A/California/04/2009. Los restos que están implicados directa o indirectamente en la unión α 2-6 están destacados en gris. (C) *Alineamiento de secuencias de HA de gripe H1N1 procedente de la cepa pandémica de 1918 (SC_1_18), aislado porcino de 1930 (SwIA_15_30) y una Cepa de "gripe porcina" (Cal_04_09).* SC_1_18 (SEQ ID NO: 43) = A/South Carolina/1/1918; SwIA_15_30 (SEQ ID NO: 44) = A/Swine/IA/15/1930; ACal_04_09 (SEQ ID NO: 45) = A/California/04/2009. Los restos que están implicados directa o indirectamente en la unión α 2-6 están destacados en gris.

30

35

40

Figura 5. Marco conservado para comprender la especificidad del receptor de glicano. Los glicanos con unión α 2-3 y/o α 2-6 pueden adoptar diferentes topologías. De acuerdo con la presente invención, la capacidad de un polipéptido HA de unirse a ciertas de estas topologías le confiere la capacidad de mediar la infección de diferentes hospedadores, por ejemplo, seres humanos. Como se ilustra en el panel A de esta figura, la presente invención define dos topologías particularmente relevantes, una topología de tipo "cono" y una topología de tipo "sombrialla". La topología de tipo cono puede adoptarse por glicanos con unión α 2-3 y/o α 2-6, y es típica de oligosacáridos cortos u oligosacáridos ramificados unidos a un núcleo (aunque esta topología puede adoptarse por ciertos oligosacáridos largos). La topología de tipo sombrilla solo puede adoptarse por los glicanos con unión α 2-6 (supuestamente debido a la mayor pluralidad conformacional aportada por el enlace extra C5-C6 que está presente en la unión α 2-6), y se adopta predominantemente por oligosacáridos largos o glicanos ramificados con ramificaciones de oligosacáridos largos, que contienen particularmente el motivo Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3/4GlcNAc-. Como se describe en el presente documento, la capacidad de los polipéptidos HA de unirse a la topología de glicano de tipo sombrilla, confiere unión a receptores humanos y/o la capacidad de mediar la infección de seres humanos. El panel B de esta Figura muestra específicamente la topología de α 2-3 y α 2-6 gobernada por los ángulos de torsión glicosídicos de los motivos de trisacárido Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3/4GlcNAc y Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc respectivamente. Se definió un parámetro, el ángulo (θ) entre el átomo C2 de Neu5Ac y los átomos C1 de los azúcares posteriores Gal y GlcNAc en estos motivos de trisacárido para caracterizar la topología. La superposición del contorno de θ y los mapas conformacionales de los motivos α 2-3 y α 2-6 muestran que los motivos α 2-3 adoptan el 100 % de la topología de tipo cono y los motivos α 2-6 mostraron tanto la topología de tipo cono como la topología de tipo sombrilla (Panel C). En la topología de tipo cono mostrada por α 2-3 y α 2-6, GlcNAc y los azúcares posteriores están situados a lo largo de una región que abarca un cono. Las interacciones de HA con la topología de tipo cono principalmente implican contactos de aminoácidos en las posiciones numeradas (basándose en la numeración de H3 HA) con azúcares Neu5Ac y Gal. Por otra parte, en la topología de tipo sombrilla, que es única para α 2-6, GlcNAc y los azúcares

50

55

60

65

posteriores se doblan hacia el sitio de unión de HA (como se observa en las estructuras co-cristalinas de HA- α 2-6). Esta conformación se favorecería con la longitud de los oligosacáridos α 2-6 (por ejemplo, al menos un tetrasacárido) ya que se estabiliza por contactos de van der Waals intra-azúcar entre los grupos acetilo de GlcNAc y Neu5Ac. Las interacciones de HA con la topología de tipo *sombrilla* implican contactos de aminoácidos en las posiciones numeradas (basándose en la numeración H3 HA) con GlcNAc y los azúcares posteriores además de los contactos con los azúcares Neu5Ac y Gal. El Panel C de esta Figura representa el muestreo conformacional de la topología de tipo cono y de tipo *sombrilla* por α 2-3 y α 2-6. Las secciones (A) – (D) muestran los mapas conformacionales (ϕ , ψ) de los enlaces Neu5Ac α 2-3Gal, Neu5Ac α 2-6Gal, Gal β 1-3GlcNAc y Gal β 1-4GlcNAc, respectivamente. Estos mapas obtenidos a partir de GlycoMaps DB (<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>) se generaron usando simulaciones MD *ab initio* usando un campo de fuerzas MM3. La distribución de energía está codificada por colores empezando en el *rojo* (que representa la máxima energía) y terminando en el *verde* que representa la mínima energía. Las regiones encerradas en un círculo 1 – 5 representan los valores (ϕ , ψ) observadas para los oligosacáridos α 2-3 y α 2-6 en las estructuras co-cristalinas de HA-glicano. La conformación *trans* (región 1 encerrada en un círculo) de Neu5Ac α 2-3Gal predomina en el bolsillo de unión de HA con la excepción de la estructura co-cristalina de HA de A/Aichi/2/68 H3N2 con α 2-3 donde esta conformación es *gauche* (región 2 encerrada en un círculo). Por otra parte, la conformación *cis* de Neu5Ac α 2-6Gal (región 3 encerrada en un círculo) predomina en el bolsillo de unión de HA. La topología de tipo *cono* se representa por las regiones 1 y 2 encerradas en círculos y la topología de tipo *sombrilla* se representa por la región 3 encerrada en un círculo. Las regiones (E) – (F) muestran la representación de las topologías de tipo *cono* y de tipo *sombrilla* por motivos α 2-3 y α 2-6, respectivamente. Las regiones marcadas en *rojo* en los mapas conformacionales se usaron como límites externos para calcular el parámetro θ (ángulo entre el átomo C2 de Neu5Ac y los átomos C1 de los azúcares posteriores Gal y GlcNAc) para una serie dada de valores (ϕ , ψ). Basándose en el valor de corte de energía, el valor de $\theta > 110^\circ$ se usó para caracterizar la topología de tipo *cono* y $\theta < 110^\circ$ se usó para caracterizar la topología de tipo *sombrilla*. La superposición del contorno de θ con el mapa de energía conformacional indicó que el motivo α 2-3 adopta una topología de tipo *cono* en un 100 % ya que era energéticamente desfavorable que adoptara la topología de tipo *sombrilla*. Por otra parte, el motivo α 2-6 representaba tanto la topología de tipo *cono* como la topología de tipo *sombrilla* y esta representación se clasificó basándose en el ángulo ω (O-C6-C5-H5) del enlace Neu5Ac α 2-6Gal.

Figura 6. Interacciones de restos de HA con topologías de glicano de tipo cono frente a sombrilla. El análisis de los co-cristales de HA-glicano revela que la posición de Neu5Ac con respecto al sitio de unión de HA es casi constante. Los contactos con Neu5Ac implican restos altamente conservados tales como F98, S/T136, W153, H183 y L/I194. Los contactos con otros azúcares implican diferentes restos, dependiendo de si el enlace de azúcar es α 2-3 o α 2-6 y si la topología de glicano es de tipo cono o *sombrilla*. Por ejemplo, en la topología de tipo cono, los contactos primarios son con los azúcares Neu5Ac y con Gal. E190 y Q226 juegan papeles particularmente importantes en esta unión. Esta Figura también ilustra otras posiciones (por ejemplo, 137, 145, 186, 187, 193, 222) que pueden participar en la unión con estructuras de cono. En algunos casos, diferentes restos pueden hacer diferentes contactos con diferentes estructuras de glicano. El tipo de aminoácidos en estas posiciones puede influir en la capacidad de un polipéptido HA de unirse a receptores con diferentes patrones de modificación y/o ramificación en las estructuras de glicano. En la topología de tipo *sombrilla*, los contactos se realizan con azúcares más allá de Neu5Ac y Gal. Esta Figura ilustra restos (por ejemplo, 137, 145, 156, 159, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 196, 222, 225, 226) que pueden participar en la unión a las estructuras de tipo *sombrilla*. En algunos casos, diferentes restos pueden hacer diferentes contactos con diferentes estructuras de glicano. El tipo de aminoácidos en estas posiciones puede influir en la capacidad de un polipéptido HA de unirse a receptores con diferentes patrones de modificación y/o ramificación en las estructuras de glicano. En algunas realizaciones, un resto D en la posición 190 y/o un resto D en la posición 225 contribuyen a la unión a las topologías de tipo *sombrilla*.

Figura 7. Topologías de tipo cono ejemplares. Esta Figura ilustra ciertas estructuras de glicano ejemplares (pero no exhaustivas) que adoptan topologías de tipo cono.

Figura 8. Topologías de tipo sombrilla ejemplares. (A) Ciertas estructuras de glicano unidas a N y unidas a O ejemplares (pero no exhaustivas) que pueden adoptar topologías de tipo *sombrilla*. (B) Ciertas estructuras de glicano unidas a O ejemplares (pero no exhaustivas) que pueden adoptar topologías de *sombrilla*.

Figura 9. Unión al receptor directo de los HA CA/04 (A) y SC18 (B) dependiente de la dosis. Para el ensayo se usó una matriz de placa de estreptavidina que comprendía glicanos α 2-3 y α 2-6 sialilados biotinilados representativos (mostrados en la leyenda). LN corresponde a lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc) y 3'SLN y 6'SLN corresponden respectivamente a Neu5Ac α 2-3 y Neu5Ac α 2-6 unidos a LN. El ensayo se realizó como se ha descrito previamente (Srinivasan *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 105: 2800, 2008) para un intervalo entero de concentraciones de HA de 0,01 – 40 μ g/ml mediante la formación previa de un complejo de HA: anticuerpo primario: anticuerpo secundario en la relación 4:2:1 para aumentar la presentación multivalente de HA. El patrón de unión selectiva a 6'SLN-LN es similar para los dos HA. Obsérvese que no se observan señales de unión detectables para HA CA/04 en concentraciones inferiores a 2 μ g/ml mientras que HA SC18 muestra una unión sustancial a esas concentraciones, lo que indica una afinidad de unión mucho mayor que HA CA/04.

Figura 10: Unión a tejido pulmonar humano de HA CA/04. En la parte superior se muestra la unión de HA CA/04 a una concentración de 20 μ g/ml a la superficie apical (flecha blanca) de secciones de tejido traqueal humano (verde frente a la tinción de yoduro de propidio en rojo). Obsérvese la unión de HA a la superficie apical del tejido traqueal que como se sabe expresa predominantemente glicanos α 2-6 sialilados (18). En la parte inferior se muestra la unión mínima de HA a una concentración de 20 μ g/ml a la sección de tejido alveolar. La unión específica de ácido siálico

de HA a la sección de tejido traqueal se confirmó por la unión mínima de HA a la sección de tejido HA pretratada con 0,2 U de Sialidasa A (expresada de forma recombinante en *Arthrobacter ureafaciens*). La unión de HA expresado de forma recombinante a los tejidos humanos se realizó como se ha descrito previamente (Chandrasekaran, *et al.*, Nat Biotechnol 26: 107, 2008; incorporado en el presente documento por referencia) mediante la formación de un precomplejo de HA: anticuerpo primario:anticuerpo secundario en la relación 4:2:1 para aumentar la presentación multivalente de HA.

Figura 11: Restos de unión a glicano de HA de H1N1. Los restos se organizan en agrupamientos que forman una red. La unidad de azúcar (numerada como se muestra en la Figura 12), que hace contacto con los agrupamientos, se muestra en la última fila. Los aminoácidos únicos en los HA de H1N1 2009 están destacados en rojo. La clave para las cepas de virus SolIS_3_06 (A/Solomon Islands/3/06); Bris_59_07 (A/Brisbane/59/07); NewCal_20_99 (A/New Caledonia/20/99); TX/15 (A/Texas/15/2009); MX/4482 (A/Mexico/4482/2009).

Figura 12: Modelo estructural de HA CA/04 unido al oligosacárido α 2-6. Los contactos de HA de CA/04 con un oligosacárido α 2-6 (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) se analizaron construyendo un modelo estructural como se ha descrito previamente (Soundararajan, *et al.*, Nat Biotechnol 27, 510, 2009; incorporado en el presente documento por referencia). En la figura se muestra la representación en viñeta del sitio de unión al glicano de HA de CA/04 donde las cadenas laterales de los aminoácidos clave se muestran en representación en barras (coloreado por átomo de carbono: gris; oxígeno: rojo; nitrógeno: azul). El oligosacárido α 2-6 se muestra como una representación en barras (coloreado por átomo de carbono: gris; oxígeno: rojo; nitrógeno: azul) y marcado en azul empezando desde el extremo Neu5Ac-1 no reductor al extremo Glc-5 reductor. La posible desestabilización de la red de interacción debido a la combinación Ile219/Glu227 está destacada en un círculo discontinuo en rojo.

Figura 13: Fijación de la interacción desacoplada en RBS de HA CA04. (A) complejo estructural de RBS de HA de CA04 con receptor humano (contactos Ile219 - Glu227 desacoplados destacados en un círculo rojo). (B) RBS de CA04M1 en complejo con receptor humano donde Lys219 (destacado en rojo) realiza contactos iónicos con Glu227. (C) RBS de CA04M2 en complejo con el receptor humano. (D) RBS de HA de SC18 en complejo con receptor humano. Las interacciones hidrófobas entre Ile219, Pro186 y Ala227 y las interacciones entre Ser187, Thr189 y Asp190 en RBS de HA de CA04M2 son similares a las interacciones entre restos análogos en HA de SC18. Los complejos estructurales se muestran en estereoisomero con RBS representado como un esquema en viñeta con cadenas laterales de aminoácidos clave. Los aminoácidos sustituidos están marcados en rojo. La representación en barras del receptor humano se muestra con los átomos de carbono en naranja.

Figura 14: Nomenclatura de glicanos usados en la matriz del glicano

Figura 15: Propiedades de unión al receptor de glicano de los HA de CA04M1 y CA04M2. (A) Unión a la matriz de glicano directa de CA04M1 dependiente de la dosis. (B) Unión a la matriz de glicano directa de CA04M2 dependiente de la dosis. (C) Curvas de unión de los HA de CA04, CA04M1, CA04M2 y SC18 a 6'SLN-LN. Los datos experimentales (marcadores desconectados indicados usando "Datos") se muestran junto con la curva de unión teórica (línea indicada usando "Modelo") generada como se describe en el Ejemplo 4. El valor de K_d' de HA de SC18 es de aproximadamente 6 pM (en el mismo intervalo que la de HA de CA04M2) y por lo tanto se indica usando el mismo marcador. (D) Unión a tejido traqueal humano de los HA de CA04, CA04M1 y CA04M2 (tinción de HA mostrada en verde frente a yoduro de propidio en rojo). La superficie apical de las secciones del tejido traqueal se indica usando una flecha blanca. La unión específica de ácido siálico de HA a las secciones de tejido traqueal se confirmó por pérdida de tinción tras el pretratamiento de las secciones de tejido con Sialidasa A (de *Arthrobacter ureafaciens*) y enzima que escinde el ácido siálico terminal tanto de receptores aviares como humanos.

Figura 16: Unión a la matriz de glicano directa de HA de CA04 dependiente de la dosis en comparación con las variantes naturales HA de CA04M3 (Asp225Glu), CA04M4 (Asp225Asn) y CA04M5 (Asp225Gly). En el panel inferior también se muestran las curvas de unión de estos HA al receptor humano representativo (6'SLN-LN) junto con las concentraciones de unión cuantificadas usando los valores de K_d' . Aunque CA04M3 y CA04M4 muestran la misma especificidad de unión al receptor humano de CA04, la concentración de unión de HA de CA04M4 > CA04 >> CA04M3. Por otra parte, CA04M5, muestra una unión dependiente de la dosis a receptores humanos a valores de señal espectacularmente inferiores y también a receptores aviares. Estas observaciones sugieren que la longitud (en comparación con la polaridad) de la cadena lateral en la posición 225 podría influir en la unión al receptor humano.

Descripción de elementos de la secuencia de HA

Elemento 1 de la secuencia de HA

El elemento 1 de la secuencia de HA es un elemento de secuencia que corresponde aproximadamente a los restos 97-185 (donde las posiciones de los restos están asignadas usando HA de H3 como referencia) de muchas proteínas HA encontradas en aislados naturales de gripe. Este elemento de secuencia tiene la estructura básica:

C (Y/F) P X₁C X₂ W X₃ W X₄ H H P, en la que:

X₁ tiene una longitud de aproximadamente 30-45 aminoácidos;

X₂ tiene una longitud de aproximadamente 5-20 aminoácidos;

X₃ tiene una longitud de aproximadamente 25-30 aminoácidos; y

X₄ tiene una longitud de aproximadamente 2 aminoácidos.

5 En algunas realizaciones, X₁ tiene una longitud de aproximadamente 35-45, o de aproximadamente 35-43, o de aproximadamente 35, 36, 37, 38, 38, 40, 41, 42 o 43 aminoácidos. En algunas realizaciones, X₂ tiene una longitud de aproximadamente 9-15, o de aproximadamente 9-14, o de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos. En algunas realizaciones, X₃ tiene una longitud de aproximadamente 26-28, o de aproximadamente 26, 27 o 28 aminoácidos. En algunas realizaciones X₄ tiene la secuencia (G/A) (I/V). En algunas realizaciones, X₄ tiene la secuencia GI; en algunas realizaciones, X₄ tiene la secuencia GV; en algunas realizaciones, X₄ tiene la secuencia AI; en algunas realizaciones, X₄ tiene la secuencia AV. En algunas realizaciones, el Elemento 1 de la secuencia de HA comprende un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, este enlace disulfuro forma un puente con restos que corresponden a las posiciones 97 y 139 (basándose en el sistema de numeración canónico de H3 utilizado en el presente documento).

15 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H1, X₁ tiene una longitud de aproximadamente 43 aminoácidos, y/o X₂ tiene una longitud de aproximadamente 13 aminoácidos, y/o X₃ tiene una longitud de aproximadamente 26 aminoácidos. En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H1, el Elemento 1 de la secuencia de HA tiene la estructura:

20 CYPX_{1A}T(A/T) (A/S) C X₂ W X₃ W X₄ H H P, en la que:

X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 27-42, o de aproximadamente 32-42, o de aproximadamente 32-40, o de aproximadamente 26-41, o de aproximadamente 31-41, o de aproximadamente 31-39, o de aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos, y X₂-X₄ son como se ha indicado anteriormente.

25 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H1, el Elemento 1 de la secuencia de HA tiene la estructura:

CYPX_{1A}T(A/T) (A/S) C X₂ W(I/L) (T/V) X_{3A} W X₄ H H P, en la que:

30 X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 27-42, o de aproximadamente 32-42, o de aproximadamente 32-40, o de aproximadamente 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos,

35 X_{3A} tiene una longitud de aproximadamente 23-28, o de aproximadamente 24-26, o de aproximadamente 24, 25 o 26 aminoácidos, y X₂ y X₄ son como se ha indicado anteriormente.

En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H1, el Elemento 1 de la secuencia de HA incluye la secuencia:

QLSSISSFEK,

40 típicamente dentro de X₁, (incluyendo dentro de X_{1A}) y especialmente empezando aproximadamente en el resto 12 de X₁ (como se ilustra, por ejemplo, en las Figuras 1-3)

45 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H3, X₁ tiene una longitud de aproximadamente 39 aminoácidos, y/o X₂ tiene una longitud de aproximadamente 13 aminoácidos, y/o X₃ tiene una longitud de aproximadamente 26 aminoácidos.

En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H3, el Elemento 1 de la secuencia de HA tiene la estructura:

CYPX_{1A}S(S/N)(A/S)CX₂WX₃WX₄HHP, en la que:

50 X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 27-42, o de aproximadamente 32-42, o de aproximadamente 32-40, o de aproximadamente 23-38, o de aproximadamente 28-38, o de aproximadamente 28-36, o de aproximadamente 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos, y X₂-X₄ son como se han indicado anteriormente.

55 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H3, el Elemento 1 de la secuencia de HA tiene la estructura:

CYPX_{1A}S(S/N)(A/S)CX₂WL(T/H)X_{3A}WX₄HHP, en la que:

60 X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 27-42, o de aproximadamente 32-42, o de aproximadamente 32-40, o de aproximadamente 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos,

X_{3A} tiene una longitud de aproximadamente 23-28, o de aproximadamente 24-26, o de aproximadamente 24, 25 o 26 aminoácidos, y X₂ y X₄ son como se ha indicado anteriormente.

65 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H3, el Elemento 1 de la secuencia de HA incluye la secuencia:

(L/I)(V/I)ASSGTLEF,

típicamente dentro de X_1 (incluyendo dentro de X_{1A}), y especialmente empezando aproximadamente en el resto 12 de X_1 (como se ilustra, por ejemplo, en las Figuras 1 y 2)

5 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H5, X_1 tiene una longitud de aproximadamente 42 aminoácidos, y/o X_2 tiene una longitud de aproximadamente 13 aminoácidos, y/o X_3 tiene una longitud de aproximadamente 26 aminoácidos.

10 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H5, el Elemento 1 de la secuencia de HA tiene la estructura:

CYPX_{1A}SSACX₂WX₃WX₄HHP, en la que:

15 X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 27-42, o de aproximadamente 32-42, o de aproximadamente 32-40, o de aproximadamente 23-38, o de aproximadamente 28-38, o de aproximadamente 28-36, o de aproximadamente 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos, y X_2 - X_4 son como se ha indicado anteriormente.

20 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H5, el Elemento 1 de la secuencia de HA tiene la estructura:

CYPX_{1A}SSACX₂WLIX_{3A}WX₄HHP, en la que:

25 X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 27-42, o de aproximadamente 32-42, o de aproximadamente 32-40, o de aproximadamente 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos, y

X_{3A} tiene una longitud de aproximadamente 23-28, o de aproximadamente 24-26, o de aproximadamente 24, 25 o 26 aminoácidos, y X_2 y X_4 son como se ha indicado anteriormente.

30 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H5, el Elemento 1 de la secuencia de HA está extendido (es decir, en una posición correspondiente a los restos 186-193) por la secuencia:

NDAAEEX(K/R)

35 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H5, el Elemento 1 de la secuencia de HA incluye la secuencia:

YEELKHLXSXXNHFEK,

40 típicamente dentro de X_1 , y especialmente empezando aproximadamente en el resto 6 de X_1 (como se ilustra, por ejemplo, en las Figuras 1 y 2).

Elemento 2 de la secuencia de HA

45 *El Elemento 2 de la secuencia de HA* es un elemento de secuencia que corresponde aproximadamente a los restos 324-340 (de nuevo usando un sistema de numeración basado en HA de H3) de muchas proteínas HA encontradas en aislados naturales de gripe. Este elemento de secuencia tiene la estructura básica:

GAIAGFIE

50 En algunas realizaciones, el Elemento 2 de la secuencia de HA tiene la secuencia:

PX₁GAIAGFIE, en la que:

55 X_1 tiene una longitud de aproximadamente 4-14 aminoácidos, o una longitud de aproximadamente 8-12 aminoácidos, o una longitud de aproximadamente 12, 11, 10, 9 u 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, este elemento de secuencia proporciona el sitio de escisión HA0, permitiendo la producción de HA1 y HA2.

60 En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H1, el Elemento 2 de la secuencia de HA tiene la estructura:

PS(I/V)QSRX_{1A}GAIAGFIE, en la que:

65 X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 3 aminoácidos; en algunas realizaciones, X_{1A} es G (L/I) F.

En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H3, el Elemento 2 de la secuencia de HA tiene la estructura:

PXKXTRX_{1A}GAIAGFIE, en la que:

X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 3 aminoácidos; en algunas realizaciones, X_{1A} es G (L/I) F.

En algunas realizaciones, y particularmente en polipéptidos H5, el Elemento 2 de la secuencia de HA tiene la estructura:

PQRXXXRXXRX_{1A}GAIAGFIE, en la que:

X_{1A} tiene una longitud de aproximadamente 3 aminoácidos; en algunas realizaciones, X_{1A} es G (L/I) F.

Definiciones

Afinidad: Como se muestra en la técnica, "afinidad" es una medida del ajuste con el que un ligando particular (por ejemplo, un polipéptido HA) se une a su molécula compañera (por ejemplo, y receptor de HA). En algunas realizaciones, afinidad se refiere a la resistencia de unión de una entidad con otra. Las afinidades pueden medirse de diferentes formas.

Aminoácido: Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general H₂N-C(H)(R)-COOH. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un D-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un L-aminoácido. "Aminoácido convencional" se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar encontrados comúnmente en péptidos naturales. "Aminoácido no convencional" se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos convencionales, independientemente de si se prepara de forma sintética o se obtiene a partir de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, "aminoácido sintético" incluye aminoácidos modificados químicamente, incluyendo, pero sin limitación sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas), sustituciones y/o los modificados a través de reacciones químicas y/o de forma biosintética. Los aminoácidos, incluyendo los aminoácidos carboxi- y/o amino-terminales de los péptidos, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación, grupos protectores y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la vida media circulante del péptido sin afectar de forma adversa a su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. Los aminoácidos pueden comprender una o varias modificaciones postraduccionales, tales como la asociación con una o más entidades químicas (por ejemplo, grupos metilo, grupos acetato, grupos acetilo, grupos fosfatos, restos formilo, grupos isoprenoides, grupos sulfato, restos de polietilenglicol, restos lipídicos, restos de carbohidrato, restos de biotina, etc.). El término "aminoácido" se usa indistintamente con "resto de aminoácido" y puede hacer referencia a un aminoácido libre y/o a un resto de aminoácido de un péptido. Será evidente por el contexto en el que se use dicho término si se refiere a un aminoácido libre o a un resto de un péptido.

Animal: Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, de cualquier sexo y en cualquier fase de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier fase del desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, una vaca, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero sin limitación, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o lombrices. En ciertas realizaciones, el animal es susceptible a la infección por la gripe. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, animal obtenido por ingeniería genética y/o un clon.

Aproximadamente: Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores que caen dentro de un 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique otra cosa o se deduzca otra cosa por el contexto (excepto cuando dicho número excedería el 100 % de un valor posible).

Unión: Se entenderá que el término "unión", como se usa en el presente documento, típicamente se refiere a una asociación no covalente entre agentes. En muchas realizaciones del presente documento, la unión hace referencia a glicanos particulares (por ejemplo, glicanos con topología de tipo sombrilla o glicanos con topología de tipo cono). Los expertos habituales en la técnica apreciarán que dicha unión puede ensayarse en cualquiera de una diversidad de contextos. En algunas realizaciones, la unión se evalúa con respecto a glicanos libres. En algunas realizaciones, la unión se evalúa con respecto a glicanos unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a un vehículo. En algunas de estas realizaciones, el vehículo es un polipéptido. En algunas realizaciones, la unión se evalúa con respecto a glicanos unidos a un receptor de HA. En dichas realizaciones, puede hacerse referencia a la unión a un receptor o a

la unión a glicano. En algunas realizaciones, la unión es específica ya que un agente de unión discrimina entre su compañero de unión diana y otros compañeros de unión potenciales en su entorno.

Agente de unión: En general, la expresión “agente de unión” se usa en el presente documento para hacer referencia a cualquier entidad que se una a un agente de interés. Por ejemplo, un agente de unión a HA se une a uno o más polipéptidos HA (y/o a variantes, fragmentos, y/o partes características de los mismos), como se describe en el presente documento. Los agentes de unión pueden ser de cualquier tipo químico. En algunas realizaciones, los agentes de unión son polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo). En algunas realizaciones, los agentes de unión son moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, los agentes de unión son ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son aptámeros. En algunas realizaciones, los agentes de unión son polímeros; en algunas realizaciones, los agentes de unión son no poliméricos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son carbohidratos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son lectinas. En algunas realizaciones, los agentes de unión de HA de H1 se unen a polipéptidos HA de H1. En algunas realizaciones, los agentes de unión se unen a variantes del polipéptido HA de H1 con mayor unión y/o infectividad en seres humanos. En algunos anticuerpos, un agente de unión proporcionado en el presente documento es un agente bloqueante de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, un agente de unión proporcionado en el presente documento es un agente bloqueante específico de topología de tipo sombrilla.

Biológicamente activo: Como se usa en el presente documento, la frase “biológicamente activo” se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y particularmente en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, un aparte de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido típicamente se denomina como una parte “biológicamente activa”.

Parte característica: Como se usa en el presente documento, la frase “parte característica” de una proteína o polipéptido es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que conjuntamente son característicos de una proteína o polipéptido. Cada uno de dichos tramos continuos generalmente contendrá al menos dos aminoácidos. Además, los expertos habituales en la técnica apreciarán que típicamente se necesitan al menos 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos que sean característicos de una proteína. En general, una parte característica es una que, además de la identidad de secuencia especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la proteína intacta relevante.

Secuencia característica: Una “secuencia característica” es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos, y por lo tanto puede usarse por los expertos habituales en la técnica para definir miembros de la familia.

Topología de cono: La frase “topología de cono” se usa en el presente documento para hacer referencia a una disposición tridimensional adoptada por ciertos glicanos y, en particular, por glicanos en receptores HA. Como se ilustra en las Figuras 5 y 7, la topología de tipo cono puede adoptarse por glicanos α 2-3 sialilados o por glicanos α 2-6 sialilados, y es típica de cadenas oligonucleotídicas cortas, aunque algunos oligonucleótidos largos también pueden adoptar esta conformación. La topología de tipo cono se caracteriza por los ángulos de torsión glicosídicos del enlace Neu5Ac α 2-3Gal que representa tres regiones de conformaciones de energía mínima proporcionadas por un valor ϕ (C1-C2-O-C3/C6) de aproximadamente -60, 60 o 180 y ψ (C2-O-C3/C6-H3/C5) representa -60 a 60. La Figura 7 presenta ciertos ejemplos representativos (aunque no exhaustivos) de glicanos que adoptan una topología de tipo cono.

Correspondiente a: Como se usa en el presente documento, la expresión “correspondiente a” se usa con frecuencia para designar la posición/identidad de un resto de aminoácido en un polipéptido HA. Los expertos habituales apreciarán que, por simplicidad, en el presente documento se utiliza un sistema de numeración canónico (basado en HA de H3 de tipo silvestre) como se ilustra, por ejemplo, en las Figuras 1-4), de forma que un aminoácido “correspondiente a” un resto en la posición 190, por ejemplo, no necesariamente es el 190^o aminoácido en una cadena de aminoácidos particular, sino que más bien corresponde al resto encontrado en la posición 190 en el HA de H3 de tipo silvestre; los expertos habituales en la materia apreciarán fácilmente cómo identificar los aminoácidos correspondientes.

Grado de separación separados: Como se usa en el presente documento, los aminoácidos que están un “grado de separación separados” son aminoácidos de HA que tienen efectos indirectos sobre la unión al glicano. Por ejemplo, los aminoácidos un grado de separación separados pueden: (1) interactuar con los aminoácidos de unión directa; y/o (2) afectar de otra manera a la capacidad de los aminoácidos de unión directa de interactuar con el glicano que está asociado con receptores de HA de la célula hospedadora; dichos aminoácidos separados un grado de separación pueden unirse directamente o no a los propios glicanos. Los aminoácidos separados dos grados de separación (1) interactúan con los aminoácidos separados un grado de separación y/o (2) afectan de otra manera a la capacidad de los aminoácidos separados un grado de separación de interactuar con los aminoácidos de unión directa, etc.

Aminoácidos de unión directa: Como se usa en el presente documento, la frase “aminoácidos de unión directa” se refiere a aminoácidos del polipéptido HA que interactúan directamente con uno o más glicanos que están asociados con los receptores de HA de la célula hospedadora.

5 *Obtenido por ingeniería genética:* La expresión “obtenido por ingeniería genética” como se usa en el presente documento, describe un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se ha seleccionado por el hombre. Por ejemplo, un polipéptido HA obtenido por ingeniería genética tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos HA encontrados en los aislados naturales de la gripe. En algunas realizaciones, un polipéptido HA obtenido por ingeniería genética tiene una secuencia de aminoácidos que difieren de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos HA incluidos en la base de datos NCBI.

10 *HA variante de unión y/o infectividad humana aumentada:* Como se usa en el presente documento, la frase “HA variante de unión y/o infectividad humana aumentada” se refiere a una versión de un polipéptido HA (por ejemplo de un polipéptido HA de H1) que se une a los receptores de HA encontrados en los tejidos epiteliales humanos, y particularmente a los receptores de HA humanos que tienen glicanos α 2-6 sialilados. En algunas realizaciones, los HA variantes de unión y/o infectividad humana aumentada se unen a los glicanos con topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, los HA variantes de unión y/o infectividad humana aumentada se unen a glicanos α 2-6 sialilados. En algunas realizaciones, los HA variantes de unión y/o infectividad humana aumentada se unen a glicanos α 2-6 sialilados largos. En algunas realizaciones, los HA variantes de unión y/o infectividad humana aumentada se unen a glicanos 6'SLN-LN. En algunas realizaciones, “unión humana aumentada” significa que, por ejemplo, un polipéptido HA variante muestra una mayor unión con respecto a la observada con su polipéptido HA de tipo silvestre afín (por ejemplo, una cepa de polipéptido HA de H1 de control, tal como las proporcionadas en la Tabla 1). En algunas realizaciones, “unión humana aumentada” significa que, por ejemplo, un polipéptido HA variante muestra una unión aumentada al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces con respecto a la observada con su polipéptido HA de tipo silvestre afín (por ejemplo, una cepa de polipéptido HA de H1 de control, tal como las proporcionadas en la Tabla 1). En algunas realizaciones, “infectividad aumentada” significa que, por ejemplo, la gripe que tiene un polipéptido HA variante muestra una mayor infectividad de un sujeto con respecto a la observada con su polipéptido HA de tipo silvestre afín (por ejemplo, una cepa de polipéptido HA de H1 de control, tal como las proporcionadas en la Tabla 1). En algunas realizaciones, “infectividad aumentada” significa que, por ejemplo, la gripe que tiene un polipéptido HA variante muestra una infectividad aumentada al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces de un sujeto con respecto a la observada con su polipéptido HA de tipo silvestre afín (por ejemplo, una cepa de polipéptido HA de H1 de control, tal como las proporcionadas en la Tabla 1). En algunas realizaciones, “unión humana aumentada” significa que, con respecto a la observada con su polipéptido HA de tipo silvestre afín (por ejemplo, una cepa de polipéptido HA de H1 de control, tal como las proporcionadas en la Tabla 1), un polipéptido HA de H1 variante muestra una unión que está aumentada sustancialmente en el mismo grado que el HA de H1 presente en una o más de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918, 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009), y A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, “infectividad aumentada” significa que, con respecto a la observada con su polipéptido HA de tipo silvestre afín (por ejemplo, una cepa de polipéptido HA de H1 de control, tal como las proporcionadas en la Tabla 1), la gripe que tiene un polipéptido HA de H1 variante muestra una infectividad que está aumentada sustancialmente en el mismo grado que el HA de H1 presente en una o más de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918, 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009), y A/Swine/Iowa/15/1930. En general, un polipéptido HA de H1 de unión humana aumentada como se describe en el presente documento muestra una mayor unión a los glicanos con topología de tipo sombrilla (por ejemplo, una unión aumentada al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces) y/o una discriminación aumentada en la unión a los glicanos de topología de tipo sombrilla en comparación con los glicanos con topología de tipo cono (por ejemplo, unión aumentada al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces) en comparación con un polipéptido HA de H1 encontrado en 2009 A/H1N1 (véase, por ejemplo, la Tabla 1). En algunas realizaciones, un HA de H1 de unión humana aumentada muestra una unión aumentada a los glicanos α 2-6 sialilados, por ejemplo, α 2-6 sialilados largos, por ejemplo, 6'SLN-LN, en comparación con un polipéptido HA de H1 encontrado en 2009 A/H1N1 (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Como apreciarán los expertos habituales en la materia, dicha unión y/o infectividad aumentada puede evaluarse usando cualquiera de una diversidad de ensayos que incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

60 *Polipéptido de H1:* Un “polipéptido de H1”, según se usa este término en el presente documento, es un polipéptido HA cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un elemento de secuencia que es característico de H1 y distingue H1 de otros subtipos de HA. Estos elementos de secuencia representativos pueden determinarse por alineamientos tales como, por ejemplo, los ilustrados en las Figuras 1-4 e incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento con respecto a realizaciones específicas de H1 de los Elementos de Secuencia de HA.

Polipéptido de H3: Un “polipéptido de H3”, según se usa este término en el presente documento, es un polipéptido HA cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un elemento de secuencia que es característico de H3 y distingue H3 de otros subtipos de HA. Estos elementos de secuencia representativos pueden determinarse por alineamientos tales como, por ejemplo, los ilustrados en las Figuras 1 y 2 e incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento con respecto a realizaciones específicas de H3 de Elementos de Secuencia de HA.

Polipéptido de H5: Un “polipéptido de H5”, según se usa este término en el presente documento, es un polipéptido HA cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un elemento de secuencia que es característico de H5 y distingue H5 de otros subtipos de HA. Estos elementos de secuencia representativos pueden determinarse por alineamientos tales como, por ejemplo, los ilustrados en las Figuras 1 y 2 e incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento con respecto a realizaciones específicas de H5 de Elementos de Secuencia de HA.

Polipéptido de hemaglutinina (HA): Como se usa en el presente documento, la expresión “polipéptido de hemaglutinina” (o “polipéptido HA”) se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una secuencia característica de HA. En la técnica se conoce una amplia diversidad de secuencias de HA de aislados de la gripe; de hecho, el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mantiene una base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/flu.html) que, en la fecha de presentación de la presente solicitud, incluía 9796 secuencias de HA. Los expertos habituales en la materia, haciendo referencia a esta base de datos, pueden identificar fácilmente secuencias que son características de polipéptidos HA en general, y/o de polipéptidos HA particulares (por ejemplo, polipéptidos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16); o de HA que median la infección de hospedadores particulares, por ejemplo, aves, camélidos, perros, gatos, gatos de algalia, ambientales, caballos, seres humanos, leopardos, visones, ratones, focas, garduñas, cerdos, tigres, ballenas, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido HA incluye uno o más elementos de secuencia característica encontrados entre aproximadamente los restos 97 y 185, 324 y 340, 96 y 100, y/o 130-230 de una proteína HA encontrada en un aislado natural de un virus de la gripe. En algunas realizaciones, un polipéptido HA tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos uno de los Elementos 1 y 2 de Secuencia de HA, como se define en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido HA tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los Elementos 1 y 2 de Secuencia de HA, en algunas realizaciones separados entre sí por aproximadamente 100 a aproximadamente 200, o por aproximadamente 125 a aproximadamente 175, o de aproximadamente 125 a aproximadamente 160, o de aproximadamente 125 a aproximadamente 150, o de aproximadamente 129 a aproximadamente 139, o de aproximadamente 129, aproximadamente 130, aproximadamente 131, aproximadamente 132, aproximadamente 133, aproximadamente 134, aproximadamente 135, aproximadamente 136, aproximadamente 137, aproximadamente 138, o aproximadamente 139 aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido HA tiene una secuencia de aminoácidos que incluye restos en las posiciones dentro las regiones 96-100 y/o 130-230 que participan en la unión a glicanos. Por ejemplo, muchos polipéptidos HA incluyen uno o más de los siguientes restos: Tyr98, Ser/Thr136, Trp153, His183 y Leu/Ile194. En algunas realizaciones, un polipéptido HA incluye al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 restos.

Identidad: Como se usa en el presente documento, el término “identidad” se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, puede realizarse alineando las dos secuencias para conseguir una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o en las dos de una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico para conseguir un alineamiento óptimo y pueden desecharse las secuencias no idénticas con fines comparativos). En ciertas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o sustancialmente un 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada que el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para conseguir un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden conseguirse usando un algoritmo matemático.

Agente de interferencia: Como se usa en el presente documento, la expresión “agente de interferencia” se refiere a cualquier entidad que se une a una diana designada (por ejemplo, a un polipéptido HA particular y/o a glicanos particulares tales como los glicanos de topología de tipo sombrilla) como se describe en el presente documento. Los agentes de interferencia pueden ser de cualquier tipo químico. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo), en algunas de estas realizaciones, los agentes de interferencia son polipéptidos HA; en otras realizaciones, los agentes de interferencia son polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos no incluye una secuencia característica de HA (es decir, “polipéptidos no HA”). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son aptámeros. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son polímeros; en algunas realizaciones, los agentes de interferencia son no poliméricos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia

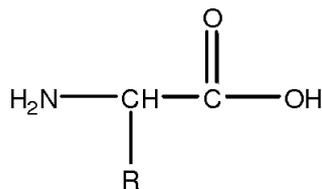
son carbohidratos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son lectinas. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia como se describen en el presente documento se unen a uno o más polipéptidos HA. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen a polipéptidos HA de H1. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen a variantes de polipéptidos HA de H1 que tienen una unión y/o infectividad humana aumentada. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia como se describen en el presente documento se unen a glicanos sialilados que tienen una topología de tipo sombrilla. En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia se unen a glicanos con topología de tipo sombrilla con una alta afinidad y/o especificidad. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia muestran una preferencia de unión por los glicanos con topología de tipo sombrilla en comparación con los glicanos de topología de tipo cono. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia compiten con la hemaglutinina por la unión a los glicanos de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, un agente de interferencia proporcionado en el presente documento es un agente bloqueante de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, un agente de interferencia proporcionado en el presente documento es un agente bloqueante específico de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen a miméticos de glicano de topología de tipo sombrilla.

Aislado: El término “aislado”, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente o entidad que (i) se ha separado de al menos parte de los componentes con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente (en la naturaleza o en una situación experimental); o (ii) se produjo por la mano del hombre. Los agentes o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o más de los otros componentes con los que estaba asociado inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados tienen una pureza mayor del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %. En algunas realizaciones, el cálculo del porcentaje de pureza de las sustancias y/o entidades aisladas no incluye excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.).

Agente Bloqueante Específico de Enlace (LSBA): Como se usa en el presente documento, la expresión “agente bloqueante específico de enlace” se refiere a un agente que se une a un receptor de HA que tiene un glicano α 2-6-sialilado. En algunas realizaciones, un LSBA se une selectivamente a un receptor de HA que tiene un glicano α 2-6-sialilado con al menos aproximadamente 40, aproximadamente 50 o aproximadamente 75 % de la afinidad de este por un receptor de HA que tiene un glicano α 2-3-sialilado. En algunas realizaciones, un LSBA se une selectivamente a un receptor de HA que tiene un glicano α 2-6-sialilado con una afinidad al menos aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 5 o aproximadamente 10 veces mayor que la que tiene por un receptor de HA que tiene un glicano α 2-3-sialilado. En algunas realizaciones, un LSBA tiene una afinidad por un glicano α 2-6-sialilado que es al menos un 50, 100, 150 o 200 % de su afinidad por un glicano α 2-3-sialilado. En algunas realizaciones, un LSBA puede competir con la hemaglutinina por la unión a un receptor de HA. Por ejemplo, un LSBA puede inhibir selectivamente la unión de una partícula de virus de la gripe (por ejemplo, virus de la gripe humana o aviar) a un receptor de HA basándose en las características del enlace (por ejemplo, glicano α 2-6-sialilado o glicano α 2-3-sialilado). En algunas realizaciones, un LSBA es un polipéptido. En algunas de estas realizaciones, un polipéptido LSBA tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica o sustancialmente homóloga a la de un polipéptido natural. En algunas realizaciones, un polipéptido LSBA es un polipéptido HA. En algunas realizaciones, un polipéptido LSBA es un polipéptido HA natural, o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un polipéptido LSBA tiene una secuencia de aminoácidos que no está relacionada con la de un polipéptido HA. En algunas realizaciones, un polipéptido LSBA es un anticuerpo o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un polipéptido LSBA es una lectina (por ejemplo, SNA-1). En algunas realizaciones, un LSBA no es un polipéptido. En algunas realizaciones, un LSBA es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, un LSBA es un ácido nucleico.

Oligosacárido largo: Para los fines de la presente divulgación, un oligosacárido típicamente se considera “largo” si incluye al menos una cadena lineal que tiene al menos cuatro restos de sacárido.

Aminoácido no natural: La frase “aminoácido no natural” se refiere a una entidad que tiene la estructura química de un aminoácido, es decir:



y, por lo tanto, es capaz de participar en al menos dos enlaces peptídicos, pero teniendo un grupo R que difiere de los que se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales también pueden tener un segundo grupo R en lugar de un hidrógeno, y/o pueden tener una o más sustituciones distintas en los restos amino o de ácido carboxílico.

Polipéptidos: Un “polipéptido”, en términos generales, es una tira de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, de los que cada uno está unido a otros por medio de al menos un enlace peptídico. Los expertos habituales en la materia apreciarán que los polipéptidos algunas veces incluyen aminoácidos “no naturales” u otras entidades que, sin embargo, son capaces de integrarse en una cadena polipeptídica, opcionalmente.

Preferentemente: Como se usa en el presente documento, una primera entidad “preferentemente” se une a una segunda entidad en comparación con una entidad de referencia si la primera entidad demuestra una mayor unión a la segunda entidad que la entidad de referencia. En algunas realizaciones, una primera entidad se unirá a una segunda entidad con una afinidad de unión que es aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 500 veces, o aproximadamente 1000 veces mayor que la de la identidad de referencia.

Puro: Como se usa en el presente documento, un agente o identidad es “puro” si está básicamente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de aproximadamente un 90 % de un agente o entidad particular típicamente se considera una preparación pura. En algunas realizaciones, un agente o entidad tiene una pureza de al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

Oligosacárido corto: Para los fines de la presente divulgación, un oligosacárido típicamente se considera “corto” si tiene menos de 4, o con toda seguridad menos de 3 restos en cualquier cadena lineal.

Especificidad: Como se muestra en la materia, “especificidad” es una medida de la capacidad de un ligando particular (por ejemplo, un polipéptido HA) de distinguir su compañero de unión (por ejemplo, un receptor de HA humano, y particularmente un receptor de HA del tracto respiratorio superior humano) de otros posibles compañeros de unión (por ejemplo, un receptor de HA aviar).

Homología sustancial: La frase “homología sustancial” se usa en el presente documento para hacer referencia a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos habituales en la materia, dos secuencias generalmente se consideran “sustancialmente homólogas” si contienen restos homólogos en posiciones correspondientes. Los restos homólogos pueden ser restos idénticos. Como alternativa, los restos homólogos pueden ser restos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien conocido por los expertos habituales en la materia, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos “hidrófobos” o “hidrófilos”, y/o como que tienen cadenas laterales “polares” o “no polares”. La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución “homóloga”. A continuación se resumen las categorías típicas de aminoácidos:

<u>Alanina</u>	Ala	A	no polar	Neutro	1,8
<u>Arginina</u>	Arg	R	polar	Positivo	-4,5
<u>Asparagina</u>	Asn	N	polar	Neutro	-3,5
<u>Ácido aspártico</u>	Asp	D	polar	Negativo	-3,5
<u>Cisteína</u>	Cys	C	no polar	Neutro	2,5
<u>Ácido glutámico</u>	Glu	E	polar	Negativo	-3,5
<u>Glutamina</u>	Gln	Q	polar	Neutro	-3,5
<u>Glicina</u>	Gly	G	no polar	Neutro	-0,4
<u>Histidina</u>	His	H	polar	Positivo	-3,2
<u>Isoleucina</u>	Ile	I	no polar	Neutro	4,5
<u>Leucina</u>	Leu	L	no polar	Neutro	3,8
<u>Lisina</u>	Lys	K	polar	Positivo	-3,9
<u>Metionina</u>	Met	M	no polar	Neutro	1,9
<u>Fenilalanina</u>	Phe	F	no polar	Neutro	2,8
<u>Prolina</u>	Pro	P	no polar	Neutro	-1,6
<u>Serina</u>	Ser	S	polar	Neutro	-0,8
<u>Treonina</u>	Thr	T	polar	Neutro	-0,7
<u>Triptófano</u>	Trp	W	no polar	Neutro	-0,9
<u>Tirosina</u>	Tyr	Y	polar	Neutro	-1,3
<u>Valina</u>	Val	V	no polar	Neutro	4,2

Aminoácidos Ambiguos	3-Letras	1-Letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o Isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Como es bien conocido en este campo, las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico pueden compararse usando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Se describen estos programas como ejemplo en Altschul, *et al.*, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, Methods in Enzymology; Altschul, *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, *et al.*, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999; todos ellos incorporados en el presente documento por referencia. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son homólogos en un tramo relevante de restos. En algunas realizaciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más restos.

Identidad sustancial: La frase "identidad sustancial" se usa en el presente documento para hacer referencia a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos habituales en la materia, dos secuencias se consideran en general "sustancialmente idénticas" si contienen restos idénticos en posiciones correspondientes. Como es bien conocido en este campo, las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico pueden compararse usando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Se describen estos programas como ejemplo en Altschul, *et al.*, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, Methods in Enzymology; Altschul, *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, *et al.*, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999; todos ellos incorporados en el presente documento por referencia. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son idénticos en un tramo relevante de restos. En algunas realizaciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más restos.

Padece: Un individuo que "padece" una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, infección gripal) es uno al que se le ha diagnosticado y/o presenta uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección.

Susceptible de padecer: Un individuo que es "susceptible de padecer" una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, infección gripal) es un individuo al que no se le ha diagnosticado una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible de padecer una enfermedad, trastorno y/o afección puede presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible de padecer una enfermedad, trastorno y/o afección puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible de padecer una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible de padecer una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

Agente terapéutico: Como se usa en el presente documento, la frase "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o induce un efecto biológico y/o farmacológico deseado. En algunas realizaciones, un agente terapéutico es cualquier sustancia que puede usarse para aliviar, mejorar, mitigar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio de, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de la infección gripal.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de composición de la invención que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible de padecer una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, infección gripal) para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar el inicio de la enfermedad, trastorno y/o afección.

Tratamiento: Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a cualquier método usado para aliviar, mejorar, mitigar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia, parcial o completamente, de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, infección gripal). El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse a un sujeto

que presenta solo los primeros signos de la enfermedad, trastorno y/o afección para reducir el riesgo de desarrollar la patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección.

5 *Topología de tipo sombrilla*: La frase “topología de tipo *sombrilla*” se usa en el presente documento para hacer referencia a una disposición tridimensional adoptada por ciertos glicanos y, en particular, por glicanos unidos a receptores de HA. La presente invención incluye el reconocimiento de que la unión a los glicanos con topología de tipo *sombrilla* es característica de proteínas HA que median la infección de hospedadores humanos. Como se ilustra en la Figura 5, la topología de tipo *sombrilla* típicamente se adopta solo por glicanos α 2-6 sialilados, y es típica de oligosacáridos largos (por ejemplo, mayores que tetrasacáridos). En algunas realizaciones, los glicanos con topología de tipo *sombrilla* son glicanos que presentan una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura presentada en la Figura 5A (panel derecho). En algunas realizaciones, los glicanos con topología de tipo *sombrilla* son glicanos que contactan con polipéptidos HA a través de los restos de aminoácido mostrados en la Figura 5B-2 (panel derecho) y la Figura 6 (panel derecho). En algunas realizaciones, los glicanos con topología de tipo *sombrilla* son glicanos que pueden contactar y/o unirse específicamente al bolsillo de unión de aminoácidos mostrado en la Figura 5B-2 (panel derecho). En algunas realizaciones, la topología estructural del glicano se clasifica basándose en el parámetro θ definido como el ángulo entre C_2 de Sia, C_1 de Gal, y C_1 de GlcNAc. Los valores de $\theta < 100^\circ$ representan la topología de tipo *cono* adoptada por α 2-3 y α 2-6 glicanos cortos. Los valores de $\theta > 110^\circ$ representan la topología de tipo *sombrilla*, tal como la topología adoptada por α 2-6 glicanos largos (Figura 6). Un ejemplo de topología de tipo *sombrilla* se proporciona por el ángulo ϕ del enlace Neu5Aca2-6Gal de aproximadamente -60° . La Figura 8 presenta ciertos ejemplos representativos (aunque no exhaustivos) de glicanos que pueden adoptar una topología de tipo *sombrilla*. Los motivos α 2-6 largos presentados en la Figura 8 incluyen Neu5Aca2-6 unidos en el extremo no reductor a una cadena larga (por ejemplo, al menos un trisacárido) encontrado como parte de glicanos unidos a N, glicanos unidos a O y glicolípidos biológicos. El recuadro muestra ejemplos de los restos de α 2-6 glicano largos de topología de tipo *sombrilla* que se encuentran como parte de glicanos biológicos que se unen con alta afinidad a HA. En algunas realizaciones, los glicanos con topología de tipo *sombrilla* (por ejemplo, en un sitio) comprenden una mayor proporción de ramificaciones de α 2-6 oligosacárido largas (por ejemplo, múltiples unidades de lactosamina) que ramificaciones α 2-6 cortas (por ejemplo, una sola lactosamina). En algunas realizaciones, los glicanos con topología de tipo *sombrilla* (por ejemplo, en un sitio) comprenden aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces, o más que aproximadamente 50 veces más ramificaciones de α 2-6 oligosacárido largas que ramificaciones α 2-6 cortas (por ejemplo, una sola lactosamina). En ciertas realizaciones, la característica única de las interacciones de HA con glicanos de topología de tipo *sombrilla* y/o señuelos de glicano es el contacto de HA con un glicano que comprende ácido siálico (SA) y/o análogos de SA en el extremo no reductor. En algunas realizaciones, la longitud de la cadena del oligosacárido es al menos un trisacárido (excluyendo el SA o análogo de SA). En algunas realizaciones, una combinación de los restos numerados mostrada en las Figuras 5A y 5B-2 (paneles al lado derecho) está implicada en contactos con topología de tipo *sombrilla*. En ciertas realizaciones, los glicanos de topología de tipo *sombrilla* son oligosacáridos de la siguiente forma:

40 Neu5Aca2-6Sug1-Sug2-Sug3

donde:

45 (a) Neu5Ac α 2-6 está típicamente (pero no esencialmente) en el extremo no reductor;

(b) Sug1:

(i) es una hexosa (frecuentemente Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β - para la extensión unida a N y a O y α - en el caso de GalNAc α - que está unida a través de O a la glicoproteína);

50 (ii) ningún azúcar distinto de Neu5Aca2-6 está unido a ninguna de las posiciones no reductoras de Sug1 (excepto cuando Sug1 es GalNAc α - que está unido a través de O a la glicoproteína); y/o

(iii) restos que no son azúcares tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc., pueden estar unidos a posiciones no reductoras (típicamente posición 6) de Sug1 (por ejemplo, para mejorar contactos con HA);

(c) Sug2 y/o Sug3 son:

55 (i) hexosa (con frecuencia Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β); y/o

(ii) azúcares (tales como Fuc) o restos que no son azúcares tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc., pueden unirse a las posiciones no reductoras de Sug2, Sug3 y/o Sug4;

60 (d) El enlace entre dos azúcares cualesquiera en el oligosacárido aparte del enlace Neu5Aca2-6 puede ser 1-2, 1-3, 1-4 y/o 1-6 (típicamente 1-3 o 1-4); y/o

(e) La estructura en la que Neu5Aca2-6 está unido a GalNAc α que está unido a través de O a la glicoproteína y azúcares adicionales está unida al extremo no reductor de GalNAc α por ejemplo

65 (i) Neu5Aca2-6(Neu5Aca2-3Gal β 1-3)GalNAc α -

(ii) Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -

Agente bloqueante con topología de tipo sombrilla (UTBA): Como se usa en el presente documento, la expresión “agente bloqueante con topología de tipo sombrilla” se refiere a un agente que se une a un receptor de HA que tiene un glicano con topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, un UTBA se une a un receptor de HA que tiene un glicano con topología de tipo sombrilla encontrado en las vías respiratorias superiores humanas. Un UTBA puede unirse a un glicano con topología de tipo sombrilla y/o a un glicano con topología de tipo cono. En algunas realizaciones, un UTBA se une selectivamente a un glicano con topología de tipo sombrilla con un 50, 100, 150 o 200 % de su afinidad por un glicano con topología de tipo cono. En algunas realizaciones un UTBA se une selectivamente a un glicano con topología de tipo sombrilla con un 50-150 % de su afinidad con un glicano con topología de tipo cono. En algunas realizaciones, un UTBA se une a un glicano con topología de tipo sombrilla con aproximadamente la misma afinidad que la que tiene por un glicano con topología de tipo cono. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un UTBA se une a un glicano con topología de tipo sombrilla (por ejemplo, 6'SLN-LN) con aproximadamente 50-200 %, 50-150 %, o aproximadamente la misma afinidad que con la que se une a un glicano con topología de tipo cono (por ejemplo, 3'SLN-LN). En algunas realizaciones, un UTBA inhibe selectivamente la unión de una partícula de virus de la gripe (por ejemplo, un virus de la gripe humana o aviar) al receptor de HA basándose en la topología del glicano del receptor (por ejemplo, sombrilla o cono). En algunas realizaciones, un UTBA es un polipéptido. En algunas de dichas realizaciones, un polipéptido UTBA tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica o sustancialmente homóloga a la de un polipéptido natural. En algunas realizaciones, un polipéptido UTBA es un polipéptido HA. En algunas realizaciones, un polipéptido UTBA es un polipéptido HA natural, o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un polipéptido UTBA tiene una secuencia de aminoácidos que no está relacionada con la de un polipéptido HA. En algunas realizaciones, un polipéptido UTBA es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un polipéptido UTBA es una lectina (por ejemplo, SNA-1). En algunas realizaciones, un UTBA no es un polipéptido. En algunas realizaciones, un UTBA es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, un UTBA es un ácido nucleico.

Mimético de glicano con topología de tipo sombrilla: Un “mimético de glicano con topología de tipo sombrilla” es un agente, distinto de un glicano de topología de tipo sombrilla, que se une a agentes de unión como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que se unen a polipéptidos HA. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 136, 137, 145, 153, 155, 156, 159, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 196, 222, 225, 226, 228 y combinaciones de los mismos. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 156, 159, 189, 192, 193, 196, y combinaciones de los mismos. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 186, 187, 189, 190, y combinaciones de los mismos. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 137, 145, 190, 226, 228, y combinaciones de los mismos. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 190, 222, 225, 226, y combinaciones de los mismos. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 136, 153, 155, 194, y combinaciones de los mismos. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 190 y 226. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 222, 225 y 226. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 190, 192, 193 y 225. En algunas de estas realizaciones, los miméticos de glicano con topología de tipo sombrilla son agentes que interactúan con restos de polipéptidos HA seleccionados del grupo que consiste en los restos 186, 193 y 222. Obsérvese que las posiciones de aminoácidos indicadas anteriormente están basadas en la numeración de HA de H3. En ciertas realizaciones, un mimético de glicano con topología de HA es un agente que compite con glicanos con topología de tipo sombrilla por la interacción con un polipéptido HA.

Agente bloqueante específico de topología de tipo sombrilla (UTSBA): Como se usa en el presente documento, la expresión “agente bloqueante específico de topología de tipo sombrilla” se refiere a un agente que se une a un receptor de HA que tiene un glicano con topología de tipo sombrilla encontrado en las vías respiratorias superiores humanas. Un UTSBA se une selectivamente a un HA con glicano con topología de tipo sombrilla. Por ejemplo, un UTSBA se une a un glicano con topología de tipo sombrilla (por ejemplo, 6'SLN-LN) con una afinidad aproximadamente al menos 2, 4, 5 o 10 veces mayor que con la que se une a un glicano con topología de tipo cono (por ejemplo, 3'SLN-LN). Típicamente, la afinidad de un UTSBA por un glicano con topología de tipo sombrilla es mayor de 1 nM. Típicamente la afinidad de un UTSBA por un glicano con topología de tipo cono es menor, y está al menos dentro de 2 a 3 órdenes de magnitud de la afinidad de unión de los glicanos con topología de tipo sombrilla a

HA adaptados humanos tales como SC18, Mos99, Tx91, etc., y lectinas vegetales de unión a α 2-6 tales como SNA-I. La afinidad de unión de UTSBA medida por ensayo de unión directa dependiente de la dosis típicamente sería de al menos 1 nM. Típicamente la afinidad de un UTSBA por un glicano con topología de tipo cono es como máximo de 1 a 3 órdenes de magnitud menor que la afinidad de unión de los glicanos con topología de tipo cono a HA aviares tales como Viet0405, Av18, etc. En algunas realizaciones, un UTSBA inhibe selectivamente la unión de una partícula de virus de la gripe (por ejemplo, un virus de la gripe humana o aviar) al receptor de HA (por ejemplo, un H1, H2 o H3 o un H5, H7 o H9 adaptado a humanos) basándose en la topología de glicano (por ejemplo, de tipo sombrilla o de tipo cono). En algunas realizaciones, un UTSBA es un polipéptido. En algunas de estas realizaciones, un polipéptido UTSBA tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica o sustancialmente homóloga a la de un polipéptido natural. En algunas realizaciones, un polipéptido UTSBA es un polipéptido HA. En algunas realizaciones, un polipéptido UTSBA es un polipéptido HA natural, o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un polipéptido UTSBA tiene una secuencia de aminoácidos que no está relacionada con la de un polipéptido HA. En algunas realizaciones, un polipéptido UTSBA es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, un polipéptido UTSBA es una lectina (por ejemplo, SNA-1). En algunas realizaciones, un UTSBA no es un polipéptido. En algunas realizaciones, un UTSBA es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, un UTSBA es un ácido nucleico.

Vacunación: como se usa en el presente documento, el término “vacunación” se refiere a la administración de una composición destinada a generar una respuesta inmunitaria, por ejemplo a un agente causante de una enfermedad. Para los fines de la presente invención, la vacunación puede administrarse antes, durante y/o después de la exposición a un agente causante de una enfermedad, y en ciertas realizaciones, antes, durante y/o poco después de la exposición al agente. En algunas realizaciones, la vacunación incluye múltiples administraciones, separadas de forma apropiada en el tiempo, de una composición de vacunación.

Variante: como se usa en el presente documento, el término “variante” es un término relativo que describe la relación entre un polipéptido particular (por ejemplo polipéptido HA) de interés y un polipéptido “parental” con el que se está comparando su secuencia. Un polipéptido de interés se considera una “variante” de un polipéptido parental si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del parental excepto por un pequeño número de alteraciones de secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de un 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % de los restos en la variante están sustituidos en comparación con el parental. En algunas realizaciones, una variante tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos sustituidos en comparación con el parental. A menudo, una variante tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menor de 5, 4, 3, 2 o 1) de restos funcionales sustituidos (es decir, restos que participan en una actividad biológica particular). Además, una variante típicamente no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones o deleciones, y a menudo no tiene adiciones o deleciones en comparación con el parental. Además, cualquier adición o deleción típicamente es menor de aproximadamente 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 10, 9, 8, 7, 6 y comúnmente son menores de aproximadamente 5, 4, 3 o 2 restos. En algunas realizaciones, el polipéptido parental es uno que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido HA parental puede ser uno encontrado en un aislado natural (por ejemplo de tipo silvestre) de un virus de la gripe (por ejemplo, una HA de tipo silvestre). En algunas realizaciones, un polipéptido parental HA de H1 puede corresponder al polipéptido H1 característico de cualquiera de las cepas de la gripe presentadas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, un polipéptido HA de H1 variante tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100 o más de 100 sustituciones, deleciones y/o adiciones con respecto a uno o más de los polipéptidos H1 característicos de cualquiera de las cepas de la gripe presentadas en la Tabla 1.

Vector: como se usa en el presente documento, “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de realizar una replicación extracromosómica y/o de expresar ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula hospedadora tal como una célula eucariota o procarionta. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes unidos operativamente se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

Tipo silvestre: como se entiende en la técnica, la frase “tipo silvestre” generalmente se refiere a una forma normal de una proteína o ácido nucleico, como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, se encuentran polipéptidos HA de tipo silvestre en aislados naturales del virus de la gripe. Puede encontrarse una diversidad de secuencias de HA de tipo silvestre diferentes en la base de datos de secuencias de virus de la gripe NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>.

Descripción detallada de ciertas realizaciones particulares de la invención

Entre otras cosas, la presente invención define variantes de HA de H1N1 con mayor unión y/o infectividad en humanos en comparación con un polipéptido H1 encontrado en cepas de la gripe H1N1 (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Dichas variantes pueden utilizarse, entre otras cosas, como componentes de vacunas y/o agentes terapéuticos para tratar, reducir y/o prevenir la infección humana por el virus H1N1, y particularmente por una variante con mayor unión y/o infectividad humana. Como alternativa o adicionalmente, dichas variantes pueden utilizarse como patrones en sistemas para detectar la aparición de y/o la infección con una variante de H1N1 con mayor infectividad humana.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona agentes que se unen específicamente a un polipéptido HA de H1N1, por ejemplo para usarse en detectar una infección por H1N1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que se unen específicamente a una variante H1N1 con mayor infectividad humana. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que distinguen entre variantes H1N1 con mayor infectividad humana y variantes H1N1 sin mayor infectividad humana.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona agentes que interfieren (y/o compiten) con interacciones de unión entre un polipéptido HA de H1N1 y uno o más glicanos, por ejemplo, glicanos con topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que interfieren (y/o compiten con) interacciones de unión entre un polipéptido HA de H1N1 y uno o más glicanos α 2-6 sialilados. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes que interfieren (y/o compiten) con interacciones de unión entre un polipéptido HA de H1N1 y uno o más glicanos 6'SLN-LN. En algunas realizaciones, el polipéptido HA de H1N1 cuya interacción de unión se ve interferida es una variante H1N1 con mayor infectividad humana.

15 Hemaglutinina (HA)

Los virus de la gripe son virus de ARN que se caracterizan por una envoltura de membrana lipídica que contiene dos glicoproteínas, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), incluidas en la membrana del virus particular. Hay 16 subtipos de HA conocidos y 9 subtipos de NA, y las diferentes cepas de la gripe se denominan basándose en el número de subtipos de HA y NA de la cepa. Basándose en comparaciones de identidades de secuencias de aminoácidos y de estructuras cristalinas, los subtipos de HA se han dividido en dos grupos principales y cuatro clados más pequeñas. Los diferentes subtipos de HA no necesariamente comparten una fuerte identidad en la secuencia de aminoácidos, pero las estructuras 3D generales de los diferentes subtipos de HA son similares entre sí, con varias diferencias sutiles que pueden usarse con fines de clasificación. Por ejemplo, la orientación particular de los subdominios distales de la membrana en relación con la α hélice central es una característica estructural usada comúnmente para determinar el subtipo de HA (Russell *et al.*, *Virology*, 325: 287, 2004).

HA existe en la membrana como un homotrímero de uno de 16 subtipos, denominados H1-H16. Solo tres de estos subtipos (H1, H2 y H3) se han adaptado hasta ahora para la infección humana. Una característica indicada de HA que se han adaptado a infectar a seres humanos (por ejemplo, de HA de los subtipos de la gripe pandémicos H1N1 (1918) y H3N2 (1967-68)) es su capacidad de unirse preferentemente a glicanos α 2-6 sialilados en comparación con sus progenitores aviares que preferentemente se unen a glicanos α 2-3 sialilados (Skehel y Wiley, *Annu Rev Biochem*, 69: 531, 2000; Rogers y Paulson, *Virology*, 127: 361, 1983; Rogers *et al.*, *Nature*, 304: 76, 1983; Sauter *et al.*, *Biochemistry*, 31: 9609, 1992; Connor *et al.*, *Virology*, 205: 17, 1994; Tumpey *et al.*, *Science*, 310: 77, 2005; todos ellos se incorporan en el presente documento por referencia). Los presentes inventores, sin embargo, han descubierto que la capacidad de infectar a hospedadores humanos se correlaciona menos con la unión a glicanos de un enlace particular, y más con la unión a glicanos de una topología particular (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0269342, 2010/0004195 y 2010/0125043, todas ellas se incorporan en el presente documento por referencia). De esta manera, los presentes inventores han demostrado que los HA que median en la infección de seres humanos se unen a glicanos con topología de tipo sombrilla, mostrando con frecuencia preferencia por glicanos con topología de tipo sombrilla con respecto a los glicanos con topología de tipo cono (aunque los glicanos con topología de tipo cono pueden ser o comprender glicanos α 2-6 sialilados).

Se dispone de varias estructuras cristalinas de HA de los subtipos H1 (humano y porcino), H3 (aviar) y H5 (aviar) unidos a oligosacáridos sialilados (de enlaces α 2-3 y α 2-6) y proporcionan perspectivas moleculares de los aminoácidos específicos que están implicados en distintas interacciones de los HA con estos glicanos (Eisen *et al.*, *Virology*, 232: 19, 1997; Ha *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11181, 2001; Ha *et al.*, *Virology*, 309: 209, 2003; Gamblin *et al.*, *Science*, 303: 1838, 2004; Stevens *et al.*, *Science*, 303: 1866, 2004; Russell *et al.*, *Glycocort J* 23: 85, 2006; Stevens *et al.*, *Science*, 312: 404, 2006; todos ellos se incorporan en el presente documento por referencia).

Por ejemplo, las estructuras cristalinas de H5 (A/duck/Singapore/3/97) solo o unido a un oligosacárido α 2-3 o α 2-6 sialilado identifican ciertos aminoácidos que interactúan directamente con glicanos unidos, y también aminoácidos que están separados uno o más grados de separación (Stevens *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11181, 2001; incorporado en el presente documento por referencia). En algunos casos, la conformación de estos restos es diferente en estados unidos frente a no unidos. Por ejemplo, Glu190, Lys193 y Gln226 participan en interacciones de unión directa y tienen diferentes conformaciones en el estado unido frente al estado no unido. La conformación de Asn186, que está próxima a Glu190, también es significativamente diferente en el estado unido frente al estado no unido.

Polipéptidos HA

La presente invención proporciona polipéptidos HA. Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "polipéptidos HA" incluye fragmentos de polipéptidos HA, partes (por ejemplo, partes características) de polipéptidos HA y/o variantes de polipéptidos HA. Los fragmentos de polipéptidos HA, partes de polipéptidos HA y

variantes de polipéptidos HA se describen con más detalle a continuación, en las subsecciones posteriores con el título “Partes y/o Fragmentos de Polipéptidos HA” y “Polipéptidos HA Variantes”.

La presente invención proporciona particularmente polipéptidos HA de H1. Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión “polipéptidos H1” incluye fragmentos de polipéptidos H1, partes (por ejemplo partes características) de polipéptidos H1 y/o polipéptidos que son variantes de H1. Los fragmentos de polipéptidos H1, partes de polipéptidos H1 y polipéptidos H1 variantes se describen con más detalle a continuación, en las subsecciones mostradas más adelante con el título “Partes y/o Fragmentos de Polipéptidos HA” y “Polipéptidos HA Variantes”.

En algunas realizaciones, los polipéptidos HA son polipéptidos HA aislados con características de unión designadas con respecto a los glicanos con topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA son polipéptidos HA obtenidos por ingeniería genética con características de unión designadas con respecto a los glicanos con topología de tipo sombrilla.

En algunas realizaciones, los polipéptidos HA proporcionados con características de unión designadas son polipéptidos H1. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA proporcionados son polipéptidos variantes HA de H1 que muestran mayor unión y/o infectividad en seres humanos en comparación con un polipéptido HA de H1 de referencia. En algunas realizaciones, dichos polipéptidos variantes HA de H1 se han obtenido por ingeniería genética. En algunas realizaciones, dichos polipéptidos variantes HA de H1 se han aislado a partir de cepas de la gripe encontradas en el ambiente. Los ejemplos de polipéptidos variantes HA de H1 con mayor unión y/o infectividad en seres humanos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos HA de H1 (por ejemplo, fragmentos de los mismos y/o partes características de los mismos) presentes en las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918, 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009), A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes HA de H1 con mayor unión y/o infectividad en humanos, tales como polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918, 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009) y A/Swine/Iowa/15/1930 se han obtenido por ingeniería genética para presentar una unión y/o infectividad en seres humanos incluso mayor. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA de H1 con mayor unión y/o infectividad en seres humanos específicamente excluyen polipéptidos H1 encontrados en cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918, 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009), A/Swine/Iowa/15/1930.

En algunas realizaciones, los polipéptidos HA de H1 de referencia incluyen la proteína HA de una o más de las cepas presentadas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA de H1 de referencia incluyen cualquier HA de H1 encontrado en un aislado de “gripe porcina” 2009 A/H1N1 presentado en una o las dos bases de datos portales de la Gripe GISAID (<http://platform.gisaid.org/dante-cms/live/struktur.jdante?aid=1131>) y/o la base de datos de Gripe NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>).

Tabla 1: secuencias de polipéptidos HA de H1 ejemplares encontrados en 2009 A/H1N1

Cepa	Secuencia de HA de H1
A/California/04/2009	MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVT VTHSVNLLEDKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPEC ESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSF ERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVK KGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNA DTYVFGSSRSYKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPG DKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ TPKGAINSTLQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNPSIQ SRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADL KSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNHLEKRIENLN KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKV RSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYS EEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVS LGAISF WMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 46)
A/Texas/15/09	

	<p>MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVT VTHSVNLLEDKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPEC ESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSMSSF ERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLK KGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNA DAYVFGSSRYSKKLPKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPG DKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ TPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQ SRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADL KSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNHLEKRIENLN KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKV RSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYS EEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVS LGAIF WMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 47)</p>
A/Mexico/4482/09	<p>MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVT VTHSVNLLEDKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPEC ESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSF ERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLK KGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNA DAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPG DKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ TPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQ SRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADL KSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNHLEKRIENLN KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKV RSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYS EEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVS LGAIF WMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 48)</p>

En la Tabla 2 se pueden encontrar secuencias de polipéptidos HA de H1 encontrados en las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930.

5 Tabla 2: secuencias de polipéptidos HA de H1 ejemplares de cepas de gripe H1 pandémicas

Cepa	Secuencia de HA de H1
A/South Carolina/1/1918	<p>MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVT VTHSVNLLED SHNGKLCCKLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPEC DLLLTASSWSYIVETS NSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSF EKFEIFPKTSSWPNHETT KGVTAACSYAGASSFYRNLLWLTK KGSSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTGTDQQSLYQN ADAYVSVGSSKYNRFTPEIAARPKVRDQAGRMNYYWTLLE PGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGSGIITSDAPVHDCNTK CQTPHGAINSSLFPQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRLATGLRNIP SIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGSYAA DQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNHLEKRIENLN LKVVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKV KVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNACMESVRNGTYDYPK YSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVVS LG AISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 49)</p>
A/Swine/IA/15/1930	

	<p>MKAILLVLLCAFAATNADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVT VTHSVNLLLED SHNGKLCRLGGIAPLQLGKCNIAGXXLGNPEC DLLLTVSSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSF EKFEIFPKTSSWPNHETTRGVTAACPYAGASSFYRNLLWLVK KENSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTSTDQQSLYQN ADAYVSVGSSKYDRRFTPEIAARPKVARGQAGRMNYYWTLLE PGDTITFEATGNLVAPRYAFALNRGSESGIITSDAPVHDCDTK CQTPHGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVKSTKLRMVTGLRNIP SIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGLIDGWYGYHHQNGQSGYAAD QKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTVVGKEFNLERRIKLN NKKVDDGFLDVWTYNAEMLVLENERTLDFHDSNVKNLYE KARSQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCDDACMESVRNGTYDYPK YSEESKLNREEIDGVKLESMVYQILAIYSTVASSLVLVSLG AISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 50)</p>
--	--

En algunas realizaciones, los polipéptidos HA (por ejemplo polipéptidos H1) son útiles para desarrollar y/o preparar vacunas de la gripe. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA (por ejemplo polipéptidos H1) son útiles para desarrollar y/o preparar agentes terapéuticos para la gripe. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA (por ejemplo polipéptidos H1) son útiles para desarrollar y/o preparar reactivos útiles para diagnosticar la gripe y/o determinar si un paciente se ha infectado con un virus de la gripe HA de H1. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA (por ejemplo polipéptidos H1), son útiles para la vigilancia de la aparición de un virus de la gripe HA de H1 pandémico potencial. En las secciones tituladas “Detección de Gripes que Contienen H1” y “Tratamiento” se describen con más detalle los métodos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico.

10 *Polipéptidos HA variantes*

En ciertas realizaciones, un polipéptido HA proporcionado (por ejemplo, polipéptido H1) es una variante de un polipéptido HA parental ya que su secuencia de aminoácidos es idéntica a la del HA parental excepto por un pequeño número de alteraciones de secuencia particulares. En algunas realizaciones, el HA parental es un polipéptido HA encontrado en un aislado natural de un virus de la gripe (por ejemplo, un polipéptido HA de tipo silvestre). En algunas realizaciones, el HA parental es uno de los HA indicados en la Tabla 1. Cualquiera de las partes y/o fragmentos descritos en el presente documento puede ser fragmentos y/o partes características de polipéptidos HA, como se describe en la sección presentada más adelante titulada

20 *“Partes y/o Fragmentos de Polipéptidos HA”*

En algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos HA tienen características de unión de glicano diferentes que sus polipéptidos HA parentales correspondientes. En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes de HA tienen mayor afinidad y/o especificidad por glicanos de tipo sombrilla (por ejemplo, en comparación con glicanos de tipo cono) que sus polipéptidos HA parentales afines. En ciertas realizaciones, dichas variantes de polipéptidos HA son variantes obtenidas por ingeniería genética.

En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes de HA tienen una afinidad y/o especificidad por glicanos de tipo sombrilla (por ejemplo en comparación con glicanos de tipo cono) 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que sus polipéptidos HA parentales afines. En algunas realizaciones, virus de la gripe que expresan polipéptidos variantes de HA tienen 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces más infectividad humana que un virus de la gripe que expresa sus polipéptidos HA parentales afines.

En algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos HA con características de unión de glicano alteradas tienen alternancias de secuencia en restos dentro o que afectan al sitio de unión al glicano. En algunas realizaciones, dichas sustituciones son de aminoácidos que interactúan directamente con el glicano unido; en otras realizaciones, dichas sustituciones son de aminoácidos que se han separado un grado de separación de los que interactúan con el glicano unido, ya que los aminoácidos separados un grado de separación (1) interactúan con los aminoácidos de unión directa; (2) afectan de otra manera a la capacidad de los aminoácidos de unión directa de interactuar con el glicano, pero no interactúan directamente con el glicano por sí mismos; o (3) afectan de otra manera la capacidad de los aminoácidos de unión directa de interactuar con el glicano, y también interactúan directamente con el glicano por sí mismos. Las variantes de polipéptido HA contienen sustituciones de uno o más aminoácidos de unión directa, uno o más aminoácidos de primer grado de separación, uno o más aminoácidos de segundo grado de separación o cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos HA pueden contener sustituciones de uno o más aminoácidos con incluso mayores grados de separación.

En algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos HA con características de unión a glicano alteradas tienen alteraciones de secuencias en restos que hacen contacto con azúcares más allá de Neu5Ac y Gal (véase, por ejemplo, la Figura 6).

5 En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen al menos una sustitución de aminoácidos, en comparación con una HA parental de tipo silvestre. En ciertas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 sustituciones de aminoácidos en comparación con un HA parental de tipo silvestre afín. En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen una o más sustituciones de aminoácidos separadas por al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al
10 menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500 restos de aminoácido de tipo silvestre. En algunas realizaciones, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de dichas sustituciones de aminoácido están localizadas dentro del sitio de unión a glicano. En algunas realizaciones, al
15 menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de dichas sustituciones de aminoácido están localizadas dentro del sitio de unión a glicano.

20 En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen al menos una adición y/o deleción de aminoácido en comparación con un HA parental de tipo silvestre. En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 adiciones y/o deleciones de restos. En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen una o más adiciones y/o deleciones de restos separadas por al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al
25 menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500 restos de aminoácido de tipo silvestre. En algunas realizaciones, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, aproximadamente el 100 % de dichas adiciones y/o deleciones de aminoácido están localizadas dentro del sitio de unión al glicano. En algunas realizaciones, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al
30 menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de dichas adiciones y/o deleciones de aminoácido están localizadas dentro del sitio de unión al glicano.

En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen una identidad de aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 % con un HA parental de tipo silvestre afín.

35 En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen una identidad de aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 % con un tramo contiguo de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500 o aproximadamente 550 aminoácidos de un HA parental de tipo silvestre afín.

40 En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen sustituciones, adiciones y/o deleciones de secuencia en posiciones correspondientes a uno o más de los restos 98, 136, 137, 138, 145, 153, 155, 156, 159, 183, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 215, 219, 222, 225, 226, 227 y 228. En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen sustituciones, adiciones y/o deleciones de secuencia en posiciones correspondientes a uno o más de los restos 156, 159, 189, 192, 193 y 196; y/o en posiciones correspondientes a uno o más de los restos 186, 187, 189 y 190; y/o en posiciones correspondientes a uno o más de los restos 190, 222, 225 y 226; y/o en posiciones correspondientes a uno o más de los restos 137, 145, 190, 226 y 228. En algunas
55 realizaciones, las variantes del polipéptido HA tienen sustituciones, adiciones y/o deleciones de secuencia en posiciones correspondientes a uno o más de los restos 190, 225, 226 y 228. En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA, particularmente las variantes del polipéptido H1, tienen sustituciones, adiciones y/o deleciones de secuencia correspondientes a uno o más de los restos 145, 186, 189, 219 y/o 227.

60 En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido HA, y particularmente las variantes del polipéptido H1, tienen una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a un HA parental de tipo silvestre en restos seleccionados de aminoácidos localizados en la región del polipéptido que se une directamente al glicano, incluyendo pero sin limitación los restos 136, 145 (por ejemplo Lys145), 153, 155, 156, 183, 186, 189, 190, 192, 193, 194, 196, 215, 222, 225, 226 y/o 227. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente
65 una variante del polipéptido H1 tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en restos seleccionados de aminoácidos localizados adyacentes a la

- región del polipéptido que se une directamente al glicano, incluyendo, pero sin limitación, los restos Ala/Thr137, Ala/Ser138, Pro/Ser186, Ser/Thr/Asn187, Ala/Thr189, Ile/Lys219, Glu/Ala227 y/o Lys222. En algunas realizaciones, los aminoácidos localizados adyacentes a la región del polipéptido que se une directamente al glicano influyen en la capacidad de los aminoácidos localizados en la región del polipéptido que se une directamente al glicano de mediar una interacción entre el polipéptido HA y el receptor. Por citar solo algunos ejemplos, en algunas realizaciones, Ala/Thr137 y/o Ala/Ser138 influyen sobre Thr/Ser136 y/o Gln226; Pro/Ser186, Ser/Thr/Asn187 y/o Ala/Thr189 influyen sobre Asp190; Ile/Lys219 y/o Glu/Ala227 influyen sobre Pro/Ser186; Glu227 influye sobre Lys222; y/o Lys222 influye sobre Asp225.
- En ciertas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1 tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en restos seleccionados de aminoácidos que están separados un grado de separación de los que interactúan con el glicano unido, ya que los aminoácidos separados un grado de separación (1) interactúan con los aminoácidos de unión directa; (2) afectan de otra manera a la capacidad de los aminoácidos de unión directa de interactuar con el glicano, pero no interactúan directamente con el glicano por sí mismos; o (3) afectan de otra manera a la capacidad de los aminoácidos de unión directa de interactuar con el glicano, y también interactúan directamente con el glicano por sí mismos, incluyendo pero sin limitación los restos Ala/Thr137, Ala/Ser138, Pro/Ser186, Ser/Thr/Asn187, Ala/Thr189, Ile/Lys219, Glu/Ala227 y/o Lys222.
- En ciertas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1 tiene una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en el resto 145. En ciertas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en el resto 186. En ciertas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en el resto 189. En ciertas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en el resto 219. En ciertas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en el resto 227.
- En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a un HA parental de tipo silvestre en restos seleccionados de 145, 186, 189, 219 y 227. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en restos 186, 189 y 227. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en restos 186, 189, 225 y 227. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante del polipéptido H1, tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos con respecto a una HA parental de tipo silvestre en restos 219 y 225.
- En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante H1 tiene una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Lys145Ser, Lys145Asn, Ile219Lys, Ser 186Pro, Ala189Thr, Gly227Ala. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante H1 tiene una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Lys145Ser, Lys145Asn, Ile219Lys, Ser 186Pro, Ala189Thr, Asp225Glu, Asp225Asn o Asp225Gly y/o Gly227Ala. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA tiene al menos una adición y/o deleción en una o más de las posiciones de aminoácido 145, 186, 189, 219 y/o 227. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA tiene al menos una adición y/o deleción en una o más de las posiciones de aminoácido 145, 186, 189, 219, 225 y/o 227. En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA tiene al menos una adición y/o deleción en una o más de las posiciones de aminoácido 137, 156, 186, 187, 189, 190, 193, 225, 226, 227 y/o 228.
- En algunas realizaciones, una variante del polipéptido HA, y particularmente una variante H1 tiene una o más de las siguientes series de sustituciones de aminoácidos:
- Ile219Lys
 - Ser186Pro, Ala189Thr, Glu227Ala
 - Ser186Pro, Ala189Thr
 - Ser186Pro, Glu227Ala
 - Ala189Thr, Glu227Ala
 - Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr, Glu227Ala
 - Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr
 - Ile219Lys, Ser186Pro
 - Ile219Lys, Ser186Pro, Glu227Ala
 - Ile219Lys, Glu227Ala
 - Ile219Lys, Ala189Thr, Glu227Ala

Ile219Lys, Glu227Ala
 Lys145Ser or Lys145Asn
 Lys145Ser or Lys145Asn, Ser186Pro, Ala189Thr, Glu227Ala
 Lys145Ser or Lys145Asn, Ile219Lys

5 Asp225Asn, Ile219Lys
 Asp225Asn, Ser186Pro, Ala189Thr, Glu227Ala
 Asp225Gly, Ile219Lys
 Asp225Gly, Ser186Pro, Ala189Thr, Glu227Ala
 Asp225Glu, Ile219Lys
 10 Asp225Glu, Ser186Pro, Ala189Thr, Glu227Ala

En algunas de estas realizaciones, un polipéptido HA tiene al menos una sustitución adicional en comparación con una HA de tipo silvestre, de tal forma que aumenta la afinidad y/o especificidad de la variante por glicanos de tipo sombrilla. En otras palabras, un polipéptido HA puede comprender una o más de cualquiera de las series de sustituciones de aminoácido indicadas en este párrafo y una o más sustituciones de aminoácido adicionales. Por citar solo algunos ejemplos específicos, un polipéptido HA puede comprender una o más de cualquiera de las series de sustituciones de aminoácido indicadas en este párrafo y una o más sustituciones de aminoácido adicionales, por ejemplo, en las posiciones 98, 136, 137, 138, 145, 153, 155, 156, 159, 183, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 215, 219, 222, 225, 226, 227 y 228, y/o combinaciones de las mismas.

En algunas realizaciones, un polipéptido HA tiene al menos una adición y/o delección de cualquiera de las posiciones de aminoácido y/o series de posiciones de aminoácido descritas en esta sección.

En algunas realizaciones, los polipéptidos HA (incluyendo variantes de polipéptidos HA) tienen secuencias que incluyen S145, N145, L219, P186, T189 y/o A227. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA (incluyendo variantes de polipéptidos HA) tienen secuencias que incluyen D190, D225, L226 y/o S228. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA tienen secuencias que incluyen D190 y D225; en algunas realizaciones, los polipéptidos HA tienen secuencias que incluyen L226 y S228.

En algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos HA tienen un sitio de unión abierto en comparación con una HA parental y particularmente con una HA de tipo silvestre parental.

Partes y/o fragmentos de polipéptidos HA

La presente invención proporciona partes características de polipéptidos HA y ácidos nucleicos que los codifican. En general, una parte característica es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que conjuntamente son característicos del polipéptido HA. Cada uno de estos tramos continuos generalmente contendrá al menos dos aminoácidos. Además, los expertos habituales en la materia apreciarán que típicamente se requieren al menos 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos que sean característicos de un polipéptido HA de H5. En general, una parte característica es una que, además de la identidad de secuencia especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con el polipéptido HA intacto relevante. En algunas realizaciones, las partes características de polipéptidos HA comparten características de unión a glicano con los polipéptidos HA de longitud completa relevantes.

Cualquiera de las partes y/o fragmentos descritos en el presente documento pueden ser partes y/o fragmentos de polipéptidos HA variantes como se describe en la sección anterior titulada "Polipéptidos HA Variantes".

En algunas realizaciones, un fragmento de polipéptido HA y/o parte característica de un polipéptido HA corresponde a un tramo contiguo de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500 o aproximadamente 550 aminoácidos de un HA parental de tipo silvestre afín. En algunas realizaciones, dicho tramo contiguo está presente dentro del contexto de secuencia de polipéptido que no es HA en el extremo 5', en el extremo 3', o tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' del tramo contiguo. En algunas realizaciones, la secuencia del polipéptido que no es HA es de aproximadamente 1 aminoácido, aproximadamente 2 aminoácidos, aproximadamente 3 aminoácidos, aproximadamente 4 aminoácidos, aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 6 aminoácidos, aproximadamente 7 aminoácidos, aproximadamente 8 aminoácidos, aproximadamente 9 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 250 aminoácidos, aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 750 aminoácidos, aproximadamente 1000 aminoácidos, aproximadamente 2000 aminoácidos, aproximadamente 3000 aminoácidos, aproximadamente 4000 aminoácidos, aproximadamente 5000 aminoácidos, aproximadamente 6000 aminoácidos, aproximadamente 7000 aminoácidos, aproximadamente 8000 aminoácidos, aproximadamente 9000 aminoácidos, aproximadamente 10.000 aminoácidos o más de aproximadamente 10.000 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, dos o más polipéptidos HA, fragmentos de los mismos y/o partes características de los mismos (por ejemplo, cada uno de los cuales corresponde a un tramo contiguo de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500 o aproximadamente 550 aminoácidos de un HA parental de tipo silvestre afín) están fusionados juntos en tándem. En algunas realizaciones, los polipéptidos HA en tándem comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 o más de 100 polipéptidos HA, fragmentos de los mismos y/o partes características de los mismos. En algunas realizaciones, cada polipéptido HA, fragmento del mismo y/o parte característica del mismo en dicha fusión en tándem está separado de otros fragmentos y/o porciones por un enlazador polipeptídico que no es HA.

Polipéptidos que no son HA

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos no incluye una secuencia de HA característica. Dichos polipéptidos se denominan en el presente documento "polipéptidos que no son HA". En algunas realizaciones, un polipéptido que no es HA tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de antemano (por ejemplo, por diseño racional, incluyendo, por ejemplo, introducción de alteraciones de aminoácidos estratégicos [adiciones, deleciones y/o sustituciones] en comparación con una secuencia de referencia). En algunas realizaciones, un polipéptido que no es HA tiene una secuencia de aminoácidos que se determina estocásticamente y, por ejemplo, se identifica basándose en las características de unión deseables definidas en el presente documento. Los polipéptidos que no son HA pueden ser agentes de unión, agentes de interferencia, etc., como se describe en el presente documento.

Producción de Polipéptidos

Pueden producirse polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos HA y/o polipéptidos no HA), variantes de los mismos, fragmentos de los mismos y/o partes características de los mismos (y/o ácidos nucleicos que codifican cualquiera de estos) por cualquier medio disponible.

Pueden producirse polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos), por ejemplo, utilizando un sistema de células hospedadoras modificado por ingeniería genética para expresar un ácido nucleico que codifica polipéptido.

Puede usarse cualquier sistema para producir polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características), tales como huevo, baculovirus, planta, levadura, células de Riñón Canino de Madin-Darby (MDKC) o células Vero (riñón de mono verde africano). Como alternativa o adicionalmente, los polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) pueden expresarse en células usando técnicas recombinantes, tales como mediante el uso de un vector de expresión (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL Press, 1989; incorporado en el presente documento por referencia).

Como alternativa o adicionalmente, pueden producirse polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) por medios sintéticos.

Como alternativa o adicionalmente, pueden producirse polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos), y particularmente polipéptidos HA, en el contexto de virus intacto, bien de otro modo de tipo silvestre, atenuado, muerto, etc. Pueden producirse polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en el contexto de partículas de tipo vírico.

En algunas realizaciones, pueden aislarse polipéptidos HA (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) y/o purificarse de virus de la gripe. Por ejemplo, los virus pueden cultivarse en huevos, tales como huevos de gallina embrionados, en cuyo caso el material recogido es típicamente líquido alantoideo. Como alternativa o adicionalmente, el virus de la gripe puede derivar de cualquier método usando cultivo tisular para cultivar el virus. Los sustratos celulares adecuados para cultivar el virus incluyen, por ejemplo, células de riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células de tipo MDCK, células de riñón de mono tales como células AGMK incluyendo células Vero, células epiteliales cultivadas como líneas celulares continuas, células 293T, células BK-21, células CV-1, o cualquier otro tipo celular de mamífero adecuado para la producción de virus de la gripe para fines de vacuna, fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, ATCC, Rockville, Md.). Los sustratos celulares adecuados también incluyen células humanas tales como células MRC-5. Los sustratos celulares adecuados no se limitan a líneas celulares. Por ejemplo también se incluyen células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo.

Se apreciará por los expertos en la materia que pueden generarse polipéptidos (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos), identificarse, aislarse y/o producirse cultivando células u organismos que producen el polipéptido (bien solo o bien como parte de un complejo, incluyendo como parte de una partícula vírica o un virus) en condiciones que permiten la exploración y/o selección sencilla de polipéptidos capaces de unirse con glicanos de topología de tipo sombrilla. Para proporcionar solamente un ejemplo, en algunas realizaciones, puede

ser útil producir y/o estudiar una colección de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos variantes de HA) en condiciones que revelen y/o favorezcan las variantes que se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla (por ejemplo, con especificidad y/o afinidad particulares). En algunas realizaciones, dicha colección de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos variantes de HA) resultan de la evolución en la naturaleza. En algunas realizaciones, dicha colección de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos variantes de HA) resultan de ingeniería genética. En algunas realizaciones, dicha colección de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos variantes de HA) resultan de una combinación de ingeniería genética y evolución natural.

Ácidos Nucleicos

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido HA (incluyendo una variante, un fragmento y/o una parte caracterizada del mismo). En otras realizaciones, la invención proporciona ácidos nucleicos que son complementarios de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido HA (incluyendo una variante, un fragmento y/o una parte característica del mismo).

En otras realizaciones, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que hibridan con ácidos nucleicos que codifican un polipéptido HA (incluyendo una variante, un fragmento y/o una parte característica del mismo). Dichos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, como cebadores o como sondas. Para proporcionar solamente algunos ejemplos, dichos ácidos nucleicos pueden usarse como cebadores en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como sondas para hibridación (incluyendo hibridación *in situ*) y/o como cebadores para PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más nucleótidos no naturales; en otras realizaciones, los ácidos nucleicos incluyen solamente nucleótidos naturales.

Agentes de Unión a Polipéptido de HA

La invención proporciona agentes de unión a polipéptido HA. En algunas realizaciones, los agentes de unión son entidades que se unen con uno o más polipéptidos HA (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos), como se describe en el presente documento. Los agentes de unión a polipéptido HA pueden ser de cualquier tipo químico. En algunas realizaciones, los agentes de unión son polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo). En algunas realizaciones, dichos agentes de unión son moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, dichos agentes de unión son ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, dichos agentes de unión son aptámeros. En algunas realizaciones, los agentes de unión son polímeros; en algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA no son poliméricos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son carbohidratos. En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA son lectinas.

En algunas realizaciones, los agentes de unión se unen con polipéptidos HA de H1 (incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos). En algunas realizaciones, los agentes de unión se unen con variantes de polipéptidos HA de H1 (por ejemplo, fragmentos y/o partes características de los mismos) que tienen unión y/o infectividad humana potenciada. En algunas realizaciones, un agente de unión a polipéptido HA se une con una variante de polipéptido HA de H1 con una mayor afinidad que con la que se une con un polipéptido HA de H1 parental afin. En algunas realizaciones, un agente de unión a polipéptido HA se une con una variante de unión humana potenciada de polipéptido HA de H1 con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 parental afin. En algunas realizaciones, un agente de unión a polipéptido HA se une con un virus de la gripe que expresa una variante de unión humana potenciada de polipéptido HA de H1 con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un virus de la gripe que expresa su polipéptido HA parental afin.

En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA son entidades que imitan la estructura y/o características tridimensionales de glicanos de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, dichos agentes de unión son o comprenden glicanos de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, dichos agentes de unión son entidades que se asemejan más estrechamente a glicanos de topología de tipo sombrilla de lo que se asemejan a glicanos de topología de tipo cono.

En algunas realizaciones, cuando un agente de unión se une con un polipéptido HA (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características del mismo), se bloquea la unión del polipéptido HA con receptores de HA. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un agente de unión a polipéptido HA también puede actuar como un "agente de interferencia", como se describe en la sección posterior titulada "Agentes de Interferencia de Polipéptido HA".

En algunas realizaciones, un agente de unión a polipéptido HA se une preferentemente con un polipéptido HA particular (por ejemplo, variantes, fragmentos y/o partes características del mismo). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con polipéptidos HA de H1 en comparación con

5 polipéptidos HA no de H1. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un polipéptido HA de H1 con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA no de H1. En algunas realizaciones, un agente de unión se une a un polipéptido HA de H1 que tiene una o más de las siguientes mutaciones: Lys145Ser, Lys145Asn, Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 que no tiene una o más de estas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un polipéptido HA de H1 que tiene una mutación Ile219Lys con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 que no tiene esa mutación. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un polipéptido HA de H1 que tiene las mutaciones Lys145Ser o Lys145Asn con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un polipéptido HA de H1 que tiene las mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn, Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un polipéptido HA de H1 que tiene las mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn e Ile219Lys con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones.

30 En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA no de H1. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que tiene una o más de las siguientes mutaciones Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que no tiene una o más de estas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que tiene una mutación Ile219Lys con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que no tiene esa mutación. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con un virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que tiene las mutaciones Lys145Ser o Lys145Asn con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn, Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que tiene las mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn e Ile219Lys con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que con la que se une con virus de la gripe que expresa un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones.

60 En algunas realizaciones, cuando se administran a un sujeto, los agentes de unión se unen con al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o más de los polipéptidos HA presentes con el sujeto (por ejemplo, presentes dentro de la sangre, los tejidos mucosos, etc. de un sujeto).

65

En ciertas realizaciones, se evalúa la afinidad de unión de agentes de unión con polipéptidos HA sobre una serie de concentraciones. Dicha estrategia proporciona significativamente más información, particularmente en ensayos de unión multivalente, que los análisis de una única concentración. En algunas realizaciones, por ejemplo, se evalúan las afinidades de unión de agentes de unión sobre concentraciones que varían sobre al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más de 10 veces.

En algunas realizaciones, los agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (por ejemplo, variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) son útiles para diversos métodos de diagnóstico y/o vigilancia, incluyendo pero sin limitación los descritos en la sección posterior denominada "Detección de Gripe que contiene H1".

Agentes de interferencia con polipéptido HA

La presente invención proporciona agentes de interferencia. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son entidades que se unen con dianas designadas (por ejemplo, con un polipéptido HA particular y/o con glicanos particulares, tales como glicanos de topología de tipo sombrilla) como se describe en el presente documento. Los agentes de interferencia pueden ser de cualquier tipo químico. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos); en algunas de dichas realizaciones, los agentes de interferencia son polipéptidos HA; en otras realizaciones, los agentes de interferencia son polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos no incluye una secuencia característica de HA (es decir, "polipéptidos no HA"). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son aptámeros. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son polímeros; en algunas realizaciones, los agentes de interferencia son no poliméricos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son carbohidratos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son lectinas.

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia como se describen en el presente documento se unen con uno o más polipéptidos HA (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA de H1. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con variantes de polipéptidos HA de H1 que tienen unión y/o infectividad humana potenciadas.

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia compiten con glicanos de topología de tipo sombrilla (por ejemplo, en receptores HA) por la unión con polipéptidos HA (por ejemplo, polipéptidos HA de H1 incluyendo variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA con una mayor afinidad que con la que los glicanos de topología de tipo sombrilla se unen con polipéptidos HA. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o más de 1000 veces mayor que con la que los glicanos de topología de tipo sombrilla se unen con polipéptidos HA.

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia como se describen en el presente documento se unen con glicanos sialilados que tienen una topología de tipo sombrilla (por ejemplo, en receptores de HA). En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con una alta afinidad y/o especificidad. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia muestran una preferencia de unión por glicanos de topología de tipo sombrilla en comparación con glicanos de topología de tipo cono. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia compiten con HA por la unión con glicanos en receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia compiten con HA por la unión con glicanos de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, un agente de interferencia proporcionado en el presente documento es un agente de bloqueo de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, un agente de interferencia proporcionado en el presente documento es un agente de bloqueo específico de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con miméticos de glicano de topología de tipo sombrilla.

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia compiten con polipéptidos HA (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) por la unión con glicanos de topología de tipo sombrilla (por ejemplo, en receptores de HA). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con una mayor afinidad que con la que los polipéptidos HA se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o más de 1000 veces mayor que con la que los polipéptidos HA se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla.

En ciertas realizaciones, la afinidad de unión de agentes de interferencia se evalúa sobre una serie de concentraciones. Dicha estrategia proporciona significativamente más información, particularmente en ensayos de unión multivalentes, que los análisis de una única concentración. En algunas realizaciones, por ejemplo, las

afinidades de unión de agentes de interferencia se evalúan sobre concentraciones que varían sobre al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, o más de 10 veces.

5 En algunas realizaciones, la unión de un agente de interferencia con una diana interfiere con la capacidad de un polipéptido HA para unirse con un receptor de HA. En algunas realizaciones, la unión de un agente de interferencia con una diana da como resultado aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % de reducción en la unión de un polipéptido HA para unirse con un receptor de HA. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son útiles para el tratamiento y/o la prevención de infección por gripe, por ejemplo, porque bloquea la capacidad de un polipéptido HA para unirse con un receptor de HA.

Se analizan algunos tipos de agentes de interferencia particulares en más detalle posteriormente.

15 *Agentes de interferencia que se unen con glicanos*

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia (por ejemplo, polipéptidos HA, LSBA, UTBA, UTSBA, etc.) se unen con glicanos de tipo sombrilla (y/o miméticos de glicanos de topología de tipo sombrilla), tales como los presentes en receptores de HA. En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla (y/o miméticos de glicanos de topología de tipo sombrilla) con alta afinidad. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con mayor afinidad que con la que se unen con glicanos de topología de tipo cono. En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con una pluralidad de diferentes glicanos de topología de tipo sombrilla, con frecuencia con alta afinidad y/o especificidad.

25 En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla (por ejemplo, glicanos α 2-6 sialilados largos tales como, por ejemplo, Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-) con alta afinidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con una afinidad comparable a la observada para un HA de tipo silvestre que media en la infección de un ser humano (por ejemplo, HA de H1N1 o HA de H3N2). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con una afinidad que es al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la observada en condiciones comparables para un HA de tipo silvestre que medie en la infección de seres humanos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de tipo sombrilla con una afinidad que es mayor que la observada en condiciones comparables para un HA de tipo silvestre que media en la infección de seres humanos. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia ejemplares incluyen LSBA, UTBA y/o UTSBA.

40 En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia muestran alta afinidad si muestran una señal de saturación en un ensayo de unión de matriz de glicanos multivalente tal como los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia muestran alta afinidad si muestran una señal por encima de aproximadamente 400000 o más (por ejemplo, por encima de aproximadamente 500000, 600000, 700000, 800000, etc.) en dichos estudios. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia como se describen en el presente documento muestran unión de saturación con glicanos de tipo sombrilla sobre una serie de concentraciones de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más, y en algunas realizaciones sobre un intervalo de concentraciones de hasta 10 veces o más.

45 Además, en algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla (y/o con miméticos de glicanos de topología de tipo sombrilla) más fuertemente que como se unen con glicanos de topología de tipo cono. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos de topología de tipo sombrilla con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o más de 1000 veces mayor que con la que se unen con glicanos de topología de tipo cono.

55 En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos α 2-6 sialilados; en algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen preferentemente con glicanos α 2-6 sialilados. En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con una pluralidad de glicanos α 2-6 sialilados diferentes. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia no son capaces de unirse con glicanos de α 2-3 sialilados, y en otras realizaciones los agentes de interferencia son capaces de unirse con glicanos α 2-3 sialilados.

60 En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con receptores hallados en células epiteliales respiratorias superiores humanas. En ciertas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con receptores de HA en el bronquio y/o la tráquea. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia no son capaces de unirse con receptores en el pulmón profundo, y en otras realizaciones, los agentes de interferencia son capaces de unirse con receptores en el pulmón profundo.

65

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o más de los glicanos hallados en los receptores de HA en los tejidos del tracto respiratorio superior humano (por ejemplo, células epiteliales).

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con uno o más de los glicanos ilustrados en la Figura 8. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con múltiples glicanos ilustrados en la Figura 8. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con alta afinidad y/o especificidad con glicanos ilustrados en la Figura 8. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con glicanos ilustrados en la Figura 8 preferentemente en comparación con su unión con glicanos ilustrados en la Figura 7. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con un oligosacárido de la siguiente forma:



en la que:

1. Neu5Ac α 2-6 está siempre o casi siempre en el extremo no reductor;
2. Sug1:
 - a. es una hexosa (frecuentemente Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β - para extensión unida a N y O y α en el caso de GalNAc α - que está unida a O a glicoproteína);
 - b. ningún azúcar distinto de Neu5Ac α 2-6 debería estar unido a ninguna de las posiciones no reductoras de Sug1 (excepto cuando Sug1 es GalNAc α - que está unida a O a la glicoproteína); y/o
 - c. restos no azúcares tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc., pueden estar unidos a posiciones no reductoras (típicamente posición 6) de Sug1 para mejorar los contactos con HA;
3. Sug2 y/o Sug3:
 - a. hexosa (frecuentemente Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β); y/o
 - b. azúcares (tales como Fuc) o restos no azúcares tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc., pueden estar unidos en posiciones no reductoras de Sug2, Sug3 y/o Sug4;
4. Enlace entre dos azúcares cualesquiera en el oligosacárido aparte del enlace Neu5Ac α 2-6 puede ser 1-2, 1-3, 1-4 y/o 1-6 (típicamente 1-3 o 1-4); y/o
5. La estructura en la que Neu5Ac α 2-6 está unida con GalNAc α que está unido mediante O a la glicoproteína y azúcares adicionales están unidos al extremo no reductor de GalNAc α por ejemplo
 - i. Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3)GalNAc α -
 - ii. Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -

La presente invención proporciona agentes de interferencia con especificidad de unión designada, y también proporciona agentes de interferencia con características de unión designadas con respecto a glicanos de tipo sombrilla.

Receptores de HA

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son entidades que son o comprenden receptores de HA (por ejemplo, fragmentos y/o partes características de los mismos). HA interacciona con superficies celulares uniéndose con un receptor de glicoproteína. La unión de HA (por ejemplo, polipéptidos HA de H1 y/o variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) con receptores de HA está mediada predominantemente por glicanos unidos a N en los receptores de HA. Específicamente, HA en la superficie de partículas del virus de la gripe reconoce glicanos sialilados que están asociados con receptores de HA en la superficie del hospedador celular. Después de reconocimiento y unión, la célula hospedadora incluye la célula vírica y el virus es capaz de replicar y producir muchas más partículas víricas para distribuir a células adyacentes. Algunas estructuras cristalinas de interacciones de HA-glicano ejemplares se han identificado y se presentan en la Tabla 3:

Tabla 3: Estructuras cristalinas de complejos de HA-glicano

Abreviatura (PDB ID)	Cepa vírica	Glicano (con coordenadas asignadas)
ASI30_H1_23 (1RV0)	A/Swine/Iowa/30 (H1N1)	Neu5Ac
ASI30_H1_26 (1RVT)	A/Swine/Iowa/30 (H1N1)	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc
APR34_H1_23 (1RVX)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc

APR34_H1_26 (1RVZ)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc
ADU63_H3_23 (1MQM)	A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	Neu5Ac α 3Gal
ADU63_H3_26 (1MQN)	A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	Neu5Ac α 6Gal
AAI68_H3_23 (1HGG)	A/Aichi/2/68 (H3N2)	Neu5Ac α 3Gal β 4Glc
ADS97_H5_23 (1JSN)	A/Duck/Singapore/3/97 (H5N3)	Neu5Ac α 3Gal β 3GlcNAc
ADS97_H5_26(1JSO)	A/Duck/Singapore/3/97 (H5N3)	Neu5Ac
Viet04_H5 (2FK0)	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	

Se generaron complejos de glicano α 2-6 sialilado-HA por superposición de la traza de CA de la subunidad HA1 de ADU63_H3 y ADS97_H5 y Viet04_H5 en ASI30_H1_26 y APR34_H1_26 (H1). Aunque los complejos estructurales del A/Aichi/2/68 humano (H3N2) con α 2-6 sialilados están publicados (Eisen *et al.*, 1997, *Virology*, 232:19), sus coordenadas no estaban disponibles en el banco de datos de proteínas. Se usó el programa SARF2 (<http://123d.ncifcrf.gov/sarf2.html>) para obtener el alineamiento estructural de las diferentes subunidades HA1 para superposición.

Se modifican receptores de HA por glicanos α 2-3 o α 2-6 sialilados cerca del sitio de unión a HA del receptor, y el tipo de enlace del glicano unido a receptor puede afectar a la conformación del sitio de unión a HA del receptor, afectando de este modo a la especificidad del receptor por diferentes HA.

5 Por ejemplo, el bolsillo de unión a glicano de HA aviar es estrecho. De acuerdo con la presente invención, este bolsillo se une con la conformación en *trans* de glicanos α 2-3 sialilados, y/o con glicanos de topología de tipo cono, bien α 2-3 o bien α 2-6 ligados.

10 Los receptores de HA en tejidos aviares, y también en pulmón profundo humano y tejidos del tracto gastrointestinal (GI) se caracterizan por enlaces de glicano α 2-3 sialilados y además (de acuerdo con la presente invención), se caracterizan por glicanos, incluyendo α 2-3 sialilados y/o α 2-6 sialilados, que adoptan predominantemente topologías de tipo cono. Los receptores de HA que tienen dichos glicanos de topología de tipo cono pueden denominarse en el presente documento CTHArs.

15 Por el contrario, los receptores de HA humanos en el bronquio y la tráquea del tracto respiratorio superior se modifican por glicanos α 2-6 sialilados. A diferencia del motivo α 2-3, el motivo α 2-6 tiene un grado adicional de libertad conformacional debido al enlace C6-C5 (Russell *et al.*, *Glycoconj J* 23:85, 2006; incorporado en el presente documento por referencia). Los HA que se unen con dichos glicanos α 2-6 sialilados tienen un bolsillo de unión más abierto para acomodar la diversidad de estructuras que surgen de esta libertad conformacional. Además, de acuerdo con la presente invención, los HA pueden necesitar unirse a glicanos (por ejemplo, glicanos α 2-6 sialilados) en una topología de tipo sombrilla, y particularmente pueden necesitar unirse con dichos glicanos de topología de tipo sombrilla con fuerte afinidad y/o especificidad, para mediar eficazmente en la infección de tejidos de tracto respiratorio superior. Los receptores de HA que tienen glicanos de topología de tipo sombrilla pueden denominarse en el presente documento UTHArs.

20 Como resultado de estos perfiles de glucosilación espacialmente restringidos, los seres humanos no se infectan habitualmente por virus que contienen muchos HA de cerdo de tipo silvestre (por ejemplo, H1 de cerdo). Específicamente, debido a que las partes del tracto respiratorio humano que más probablemente se encuentren con el virus (es decir, la tráquea y los bronquios) carecen de receptores con glicanos de tipo cono (por ejemplo, glicanos α 2-3 sialilados, y/o glicanos cortos) y los HA de cerdo de tipo silvestre típicamente se unen principalmente o exclusivamente con receptores asociados con glicanos de tipo cono (por ejemplo, glicano α 2-3 sialilados, y/o glicanos cortos), los seres humanos se infectan en pocas ocasiones con virus de cerdo. Solamente cuando están en contacto suficientemente estrecho con el virus para que este pueda acceder a los receptores del pulmón profundo y/o tracto gastrointestinal que tienen glicanos de tipo sombrilla (por ejemplo, glicanos α 2-6 sialilados largos), los humanos se infectan.

Lectinas

40 En algunas realizaciones, los agentes de unión proporcionados de acuerdo con la presente invención son lectinas. Las lectinas son proteínas de unión a azúcares que pueden unirse con un carbohidrato soluble o con un resto de carbohidrato que es una parte de un glicoconjugado (por ejemplo, un glicopéptido o un glicolípido). Las lectinas típicamente aglutinan ciertas células animales y/o precipitan glicoconjugados reconociendo un resto de azúcar particular. Por ejemplo, SNA-1 es una lectina que tiene una alta afinidad por ácidos α 2-6 siálicos. Como otro ejemplo más, las lectinas de *Polyporus squamosus* (PSL1a y PSL1b) tienen una alta afinidad por unión con glicoconjugados sialilados que contienen secuencias trisacáridas Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc/GlcNAc de glicoproteínas ligadas a asparagina. Las lectinas ejemplares no limitantes que pueden actuar como agentes de unión incluyen SNA-1, SNA-1', PSL1a, PSL1b, y polipéptidos derivados de las mismas.

50 Se proporcionan a continuación secuencias de aminoácidos de lectinas ejemplares:

Lectina 1 de *Sambucus nigra* (N.º de referencia en Genbank U27122):

MRLVAKLLYLAVLAICGLGIHGALHPRVTPPVYPSVSFNLTGADTYEPFLRALQEK
 VILGNHTAFDLPVLNPESQVSDSNRFVLVPLTNPSGDTVTLAIDVVNLYVVAFASSNGK
 SYFFSGSTAVQRDNLFVDTTQEELNFTGNYTSLERQVGFGRVYIPLGPKSLDQAISL
 RTYTLTAGDTKPLARGLLVVIQMVSEAAFRYIELRIRTSITDASEFTPDLLMLSMEN
 NWSSMSSEIQQAQPGGIFAGVVQLRDERNNSIEVTNFRRLFELTYIAVLLYGCAPVTS
 SSSYNNIDAQIIKMPVFRGGEYEKVCVVEVTRRISGWDGLCVDRVYGHYIDGNPV
 QLRPCGNECNQLWTFRTDGTIRWLGKCLTASSSVMIYDCNTVPPEATKVVVSIDGTI
 TNPHSGLVLTAPQAAEGTALSLENNIHAARQGWTVGDVEPLVTFIVGYKQMCLREN
 GENNFVWLEDCVLNRVQEWALYGDGTIRVNSNRSLCVTSEDHEPSDLIVILKCEGS
 GNQRWVFNTNGTISNPNKLLMDVAQRDVSLRKIILYRPTGNPNQQWITTHPA
 (SEQ ID NO: 51)

Lectina 1' de *Sambucus nigra* (N.º de referencia en Genbank U66191):

MKVVATILYLVLVLAICGLGIHGAHPTHSAPPTVYPSVSFNLTEANSNEYRHFLQELRG
 KVILGSHRAFDLPVLNPESKVSDDRFVLVRLTNPSRKKVTLAIDVVTFYVVAFAQN
 DRSYFFSGSSEVQRENLFVDTTQEDLNFKGDYTSLEHQVGFGRVYIPLGPKSLAQSSIS
 SLSTYKSSAGDNKRLARSLVVIQMVSEAAFRYIQLRIQASITDAKEFTPDLLMLSM
 ENKWSMSSEIQQAQPGGAFQVVKLLDQRNHPIDVTNFRRLFQLTSVAVLLHGCPT
 VTKMPAYIIKMPVFNNGEEDERCSSVVEVTRRIGGRDGFCAEVKNGDEKDGTPVQLS
 SCGEQSNQQWTFSTDGTIQLSLGKCLTSSSVMIYNCKVVPPESTKWVVSIDGTITNPR
 SGLVLTAPKAAEGTLVSLEKNVHAARQGWIVGNVEPLVTFIVGYEQMCLETNPGNN
 DVSLGDCSVKSASKVDQKWALYGDGTIRVNDRSLCVTSEGKSSNEPIIILKCLGWA
 NQRWVFNTDGTISNPD SKLVMHVDQNDVPLRKIILSHPSGTSNQQWIASTHPA (SEQ
 ID NO: 52)

5

Lectina 1a de *Polyporus squamosus* (UniProt Q75WT9)

MSFQGHGIYYIASAYVANTRLALSEDSSANKSPDVISSDAVDPLNNLWLEPVGEAD
 TYTVRNAFAGSYMDLAGHAATDGTAIIGYRPTGGDNQKWISQINDVWIKSKETGT
 FVTLNNGDGGGTGTVVWQNTNNTSQNWTFQKLSQTGANVHATLLACPALRQDF
 KSYLSDGLYLVLTRDQISSIWQASGLGSTPWRSEIFDCDDFATVFKGAVAKWGNENF
 KANGFALLCGLMFGSKSSGAHAYNWFVERGNFSTVTFEPQNGTYSANAWDYKAY
 FGLF (SEQ ID NO: 53)

10

Lectina 1b de *Polyporus squamosus* (UniProt Q75WT8)

MSFEGHGIYHIPHAHVANIRMALANRSGSQNGTPVIAWDSNNDADFHMWLVEPTGE
 ADTYTIHNVSTGTYMDVTASAVADNTPIIGYQRTGNDNQKWIRQVQTDGGDRPWK
 IQCKATGTFATLYSGGSGTAIVGWRLVNSNGNQDWVQKLSQTSVNVHATLLACG
 ATVQGDFKNLYLDGLYLVLPRDRISAIWKASGLGETARRDGIYDSDEFAMTFKSA
 ATWGKENFKADGFAILCGMMFGTKASTNRHAYNWWVERGSFSTVTFEPQNGTYS
 DDAWGYKAYFGLF (SEQ ID NO: 54)

15 *Agentes de interferencia que se unen con polipéptidos HA*

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son entidades que se unen con polipéptidos HA (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos), tales como cualquiera de los polipéptidos HA descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son entidades que se unen con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos). En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA de H1 con mayor afinidad que con la que se unen con polipéptidos HA no de H1. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA de H1 con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o más de 1000 veces mayor que con que la que se unen con polipéptidos HA no de H1. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA de H1 que tienen una o más de las siguientes mutaciones: Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o más de 1000 veces mayor que con la que se unen con polipéptidos HA de H1 que no tienen una o más de estas mutaciones. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia se unen con polipéptidos HA de H1 que tienen una mutación Ile219Lys con una afinidad 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o más de 1000

20

25

30

presente documento pueden ser útiles como agentes terapéuticos para tratamiento y/o la prevención de gripe que expresa polipéptidos HA de H1 que tienen las mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn y Ile219Lys.

5 En algunas realizaciones, cuando se administran a un sujeto, los agentes de interferencia se unen con al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o más de los polipéptidos HA (por ejemplo, de los polipéptidos H1 y/o de las variantes de polipéptidos H1 con unión y/o infectividad humana potenciada) presentes con el sujeto (por ejemplo, presentes dentro de la sangre, los tejidos mucosos, etc., de un sujeto).

Aptámeros

15 En algunas realizaciones, los agentes de unión proporcionados de acuerdo con la presente invención son aptámeros. Los agentes de interferencia a aptámeros pueden actuar uniéndose con glicanos de topología de tipo sombrilla y/o polipéptidos HA, por ejemplo, polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos).

20 Los aptámeros son macromoléculas compuestas de ácido nucleico (por ejemplo, ARN, ADN) que se unen estrechamente con una diana molecular específica (por ejemplo, un glicano de topología de tipo sombrilla y/o un polipéptido HA, variante, fragmento y/o parte característica del mismo). Un aptámero particular puede describirse por una secuencia de nucleótidos lineal y es típicamente de aproximadamente 15-60 nucleótidos de longitud. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría se contempla que la cadena de nucleótidos en un aptámero forma interacciones intramoleculares que pliegan la molécula en una forma tridimensional compleja, y esta forma tridimensional permite que el aptámero se una estrechamente con la superficie de su molécula diana. Dada la extraordinaria diversidad de formas moleculares que existen dentro del universo de todas las posibles secuencias de nucleótidos, pueden obtenerse aptámeros para una amplia serie de dianas moleculares incluyendo proteínas y moléculas pequeñas. Además de alta especificidad, los aptámeros tienen muy altas afinidades por sus dianas (por ejemplo, afinidades en el intervalo de picomolar a nanomolar bajo para proteínas). Los aptámeros son químicamente estables y pueden hervirse o congelarse sin pérdida de actividad. Debido a que son moléculas sintéticas, son susceptibles de una diversidad de modificaciones, que pueden optimizar su función para aplicaciones particulares. Por ejemplo, los aptámeros pueden modificarse para reducir drásticamente su sensibilidad a degradación por enzimas en la sangre para su uso en aplicaciones *in vivo*. Además, los aptámeros pueden modificarse para alterar su biodistribución o tiempo de residencia en plasma.

La selección de aptámeros que pueden unirse con glicanos de topología de tipo sombrilla (y/o con miméticos de glicano de topología de tipo sombrilla) puede conseguirse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los aptámeros pueden seleccionarse usando el método de SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) (Tuerk, C., y Gold, L., *Science* 249:505-510 (1990); incorporado en el presente documento por referencia). En el método de SELEX, una gran biblioteca de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, 10^{15} moléculas diferentes) se produce y/o se explora con una molécula diana (por ejemplo, un glicano de topología de tipo sombrilla y/o un polipéptido HA, variante, fragmento y/o parte característica del mismo). Se permite que una molécula diana se incube con la biblioteca de secuencias de nucleótidos durante un periodo de tiempo. Pueden usarse después varios métodos, conocidos en la técnica, para aislar físicamente las moléculas diana de aptámeros de las moléculas no unidas en la mezcla, que pueden descartarse. Los aptámeros con la mayor afinidad por la molécula diana pueden después purificarse de la molécula diana y amplificarse enzimáticamente para producir una nueva biblioteca de moléculas que está sustancialmente enriquecida para aptámeros que pueden unirse con la molécula diana. La biblioteca enriquecida puede después usarse para iniciar un nuevo ciclo de selección, división y amplificación. Después de 5-15 ciclos de este proceso por iteraciones de selección, división y amplificación, la biblioteca se reduce a un número pequeño de aptámeros que se unen estrechamente con la molécula diana. Las moléculas individuales en la mezcla pueden después aislarse, sus secuencias de nucleótidos pueden determinarse, y sus propiedades con respecto a afinidad de unión y especificidad pueden medirse y compararse. Los aptámeros aislados pueden después refinarse adicionalmente para eliminar cualquier nucleótido que no contribuya a la unión con diana y/o estructuras de aptámeros, produciendo de este modo aptámeros truncados a su dominio de unión central. Véase Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* 45:1628-1650 (1999) para una revisión de la tecnología de aptámeros; cuyas enseñanzas completas se incorporan en el presente documento por referencia.

Anticuerpos

60 En algunas realizaciones, los agentes de interferencia son anticuerpos que reconocen glicanos de topología de tipo sombrilla y/o polipéptidos HA, por ejemplo, polipéptidos HA de H1 (y/o variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos).

65 Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden prepararse por cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia (por ejemplo, véase Harlow y Lane, *Antibodies: A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporado en el presente documento por referencia). Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales, o mediante transfección de genes de anticuerpos en hospedadores celulares bacterianos o de mamíferos adecuados, para posibilitar la producción de anticuerpos recombinantes.

Los anticuerpos adecuados para la invención incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente con cualquier epítipo de glicano de topología de tipo sombrilla. Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "anticuerpos" incluya inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivas para la proteína o el péptido designados, o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos adecuados incluyen, pero sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos conjugados (es decir, anticuerpos conjugados o fusionados con otras proteínas, radiomarcadores, citotoxinas), Productos Inmunofarmacéuticos Modulares Pequeños ("SMIP™"), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos cameloides y fragmentos de anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" también incluye anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de un único dominio (por ejemplo, anticuerpos de un único dominio de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos del mismo)), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los polipéptidos de anticuerpos para su uso en el presente documento pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).

Como se usa en el presente documento, un "fragmento de anticuerpo" incluye una parte de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región de unión a antígeno o variable de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; triacuerpos; tetracuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La expresión "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética u obtenida por ingeniería genética que actúa como un anticuerpo uniéndose con un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados, fragmentos "Fv", que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en las que se conectan regiones variables de cadena ligera y pesada por un enlazador peptídico ("proteínas ScFv"), y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.

Pueden generarse anticuerpos usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen protocolos para producción de anticuerpos en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988). Típicamente, pueden generarse anticuerpos en ratón, rata, cobaya, hámster, camello, llama, tiburón u otro hospedador apropiado. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos en pollos, que producen moléculas de IgY (Schade *et al.*, (1996) ALTEX 13(5): 80-85; incorporado en el presente documento por referencia). En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para la presente invención son anticuerpos de primates subhumanos. Por ejemplo, pueden encontrarse técnicas generales para inducir anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos, por ejemplo, en Goldenberg *et al.*, publicación de patente internacional n.º WO 91/11465 (1991; incorporado en el presente documento por referencia), y en Losman *et al.*, *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990; incorporado en el presente documento por referencia). En algunas realizaciones, pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma (Milstein y Cuello, (1983) *Nature* 305(5934): 537-40; incorporado en el presente documento por referencia). En algunas realizaciones, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales por métodos recombinantes (Patente de Estados Unidos n.º 4.166.452, 1979; incorporado en el presente documento por referencia).

En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para la invención pueden incluir anticuerpos humanizados o humanos. Son formas humanizadas de anticuerpos no humanos Ig quiméricas, cadenas o fragmentos de Ig (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otra subsecuencias de unión a antígeno de Ab) que contienen secuencia mínima derivada de Ig no humana. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos de una fuente no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". Se consigue humanización sustituyendo con regiones determinantes de complementariedad de roedores (CDR) o secuencias de CDR las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Riechmann *et al.*, *Nature* 332(6162): 323-7, 1988; Verhoeyen *et al.*, *Science*. 239(4847): 1534-6, 1988; incorporado en el presente documento por referencia). Dichos anticuerpos "humanizados" son Ab quiméricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567, 1989; incorporado en el presente documento por referencia), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en Ab de roedores. Los anticuerpos humanizados incluyen Ig humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una CDR del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos no humanos correspondientes reemplazan restos de marco conservado de Fv de la Ig humana. Los acuerdos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la secuencia de CDR o marco conservado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la mayoría si no todas las regiones CDR corresponden a las de una Ig no humana y la mayoría si no todas las

regiones FR son las de una secuencia consenso de Ig humana. El anticuerpo humanizado comprende también de forma óptima al menos una parte de una región constante de Ig (Fc), típicamente la de una Ig humana (Riechmann *et al.*, Nature 332(6162): 323-7, 1988; Verhoeven *et al.*, Science. 239(4847): 1534-6, 1988; todas las cuales se incorporan el presente documento por referencia).

También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, Mol Immunol. (1991) 28(9): 1027-37; Marks *et al.*, J Mol Biol. (1991) 222(3): 581-97; todas las cuales se incorporan el presente documento por referencia) y la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Reisfeld y Sell, 1985, Cancer Surv. 4(1): 271-90; incorporado en el presente documento por referencia). De forma similar, la introducción de genes de Ig humanos en animales transgénicos en los que los genes de Ig endógenos se han inactivado parcial o completamente puede aprovecharse para sintetizar anticuerpos humanos. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la vista en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación génica, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos (Fishwild *et al.*, High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice, Nat Biotechnol. Julio de 1996; 14(7): 845-51; Lonberg *et al.*, Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications, Nature 28 de abril de 1994; 368(6474):856-9; Lonberg y Huszar, Human antibodies from transgenic mice, Int. Rev. Immunol. 1995; 13(1):65-93; Marks *et al.*, By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. Biotechnology (N Y). Julio 1992; 10(7): 779-83; todas las cuales se incorporan el presente documento por referencia).

Ensayos de agentes de interferencia en modelos animales

La presente invención proporciona métodos para ensayar un agente de interferencia (por ejemplo, polipéptidos HA, LSBA, USBA, UTSBA, glicanos de topología de tipo sombrilla, etc.) en un hospedador animal. Como se usa en el presente documento, un "hospedador animal" incluye cualquier modelo animal adecuado para investigación de gripe. Por ejemplo, los hospedadores animales adecuados para la invención pueden ser cualquier hospedador de mamífero, incluyendo primates, hurones, gatos, perros, vacas, caballos, roedores tales como ratones, hámsteres, conejos y ratas. En ciertas realizaciones, un hospedador animal usado para la invención es un hurón. En particular, en algunas realizaciones, un hospedador animal no se ha enfrentado a exposición o infección vírica antes de la administración de un agente de interferencia (opcionalmente en una composición). En algunas realizaciones, el hospedador animal se inocula con, se infecta con o se expone de otro modo a virus antes de o simultáneamente con la administración de un agente de interferencia. Un hospedador animal usado en la práctica de la presente invención puede inocularse con, infectarse con o exponerse de otro modo a virus por cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, un hospedador animal puede inocularse con, infectarse con o exponerse a virus por vía intranasal.

En algunas realizaciones, un hospedador animal adecuado puede tener una distribución similar de glicanos de topología de tipo sombrilla frente a de tipo cono y/o α 2-6 glicanos frente a α 2-3 glicanos para la distribución hallada en el tracto respiratorio humano. Por ejemplo, se contempla que un hurón como un hospedador animal puede ser más representativo que un ratón cuando se usa como un modelo de enfermedad provocada por virus de la gripe en seres humanos (Tumpey, *et al.* Science (2007) 315; 655-659; incorporado en el presente documento por referencia). Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, la presente invención abarca la idea de que los hurones pueden tener una distribución más similar de glicanos en el tracto respiratorio a las del tracto respiratorio humano que el ratón al humano.

Pueden usarse animales sin tratamiento previo y/o inoculados para cualquiera de una diversidad de estudios. Por ejemplo, dichos modelos animales pueden usarse para estudios de transmisión de virus como se conoce en la técnica. Se contempla que el uso de hurones en estudios de transmisión de virus puede actuar como un predictor fiable para transmisión de virus en seres humanos. Por ejemplo, la transmisión por aire de gripe vírica de animales inoculados (por ejemplo, hurones) a animales sin tratamiento previo se conoce en la técnica (Tumpey, *et al.* Science (2007) 315; 655-659; incorporado en el presente documento por referencia). Pueden usarse estudios de transmisión de virus para ensayar polipéptidos de agente de interferencia (por ejemplo, polipéptidos HA). Por ejemplo, pueden administrarse agentes de interferencia a un hospedador animal adecuado antes, durante o después de los estudios de transmisión de virus para determinar la eficacia dicho agente de interferencia en el bloqueo de la unión y/o infectividad de virus en el hospedador animal. Usando información recogida de estudios de transmisión de virus en un hospedador animal se puede predecir la eficacia de un agente de interferencia en el bloqueo de la unión y/o infectividad de virus en un hospedador humano.

Detección de gripes que contienen H1

La presente invención proporciona sistemas, composiciones y métodos para la detección de gripe. En algunas realizaciones, la invención proporciona agentes de unión que se unen preferentemente con un polipéptido HA en particular (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características del mismo). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con polipéptidos HA de H1 en comparación con polipéptidos HA no de H1 como se describe en más detalle en la sección anterior titulada "Agentes de Unión a Polipéptido HA". En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1

que tiene unión y/o infectividad humana potenciada en comparación con un polipéptido HA de H1 parental (por ejemplo, una cepa de gripe HA de H1 parental hallada en la Tabla 1).

En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1 que tiene una o más de las siguientes mutaciones: Lys145Ser, Lys145Asn, Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala en comparación con un polipéptido HA de H1 que no tiene una o más de esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1 que tiene una mutación Ile219Lys en comparación con un polipéptido HA de H1 que no tiene esa mutación. En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala en comparación con un polipéptido HA de H1 que no tiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Lys145Ser o Lys145Asn en comparación con un polipéptido HA de H1 que no contiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn, Ser186Pro, Ala189Thr, y Glu227Ala en comparación con un polipéptido HA de H1 que no contiene esas mutaciones. En algunas realizaciones, un agente de unión se une preferentemente con un polipéptido HA de H1 que tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn y Ile219Lys en comparación con un polipéptido HA de H1 que no contiene esas mutaciones.

En algunas realizaciones, los agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (por ejemplo, variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) son útiles para diversos métodos de diagnóstico y/o vigilancia. Por ejemplo, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA particulares, tales como polipéptidos HA de H1 (y/o variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si un paciente está infectado con y/o padece infección de un virus de la gripe. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si un paciente está infectado con y/o padece infección de un virus de la gripe H1. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si un paciente está infectado con y/o padece infección de un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 muestra unión y/o infectividad humana potenciada. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 particulares (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) para determinar si un paciente está infectado con y/o padece una infección de un virus de la gripe H1 caracterizado por que su polipéptido H1 tiene una o más de las siguientes mutaciones: Lys145Ser, Lys145Asn, Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si un paciente está infectado con y/o padece una infección de un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) para determinar si un paciente está infectado con y/o padece una infección de un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Lys145Ser o Lys145Asn. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si un paciente está infectado con y/o padece una infección de un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn, Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) para determinar si un paciente está infectado con y/o padece una infección de un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn y Ile219Lys.

En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA, tales como polipéptidos HA de H1, (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene virus de la gripe. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1. En algunas realizaciones pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos, y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 muestra unión y/o infectividad humana potenciadas. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 particulares (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1 caracterizado por que su polipéptido H1 tiene una o más de las siguientes mutaciones: Lys145Ser, Lys145Asn, Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene un virus

de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene una mutación Ile219Lys. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos, y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Lys145Ser o Lys145Asn. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn, Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de unión que se unen preferentemente con polipéptidos HA de H1 (y/o con variantes, fragmentos, y/o partes características de los mismos) en ensayos para determinar si una muestra contiene un virus de la gripe H1 caracterizado por que el polipéptido H1 tiene mutaciones Lys145Ser/Lys145Asn y Ile219Lys.

La presente invención proporciona sistemas, composiciones y métodos que utilizan agentes de unión a polipéptido HA para detectar polipéptidos HA (por ejemplo, fragmentos y/o partes características de los mismos) en muestras patológicas, incluyendo, pero sin limitación, sangre, suero/plasma, células mononucleares de sangre periférica/linfocitos de sangre periférica (PBMc/PBL), esputo, orina, heces, frotis faríngeos, frotis de lesión dérmica, líquido cefalorraquídeo, frotis del cuello uterino, muestras de pus, matrices de alimentos y tejidos de diversas partes del cuerpo tales como cerebro, bazo e hígado. La presente invención también proporciona sistemas, composiciones y métodos para detectar polipéptidos HA en muestras ambientales, incluyendo, pero sin limitación, suelo, agua y flora. También pueden ser aplicables otras muestras que no se han enumerado.

En algunas realizaciones, los métodos para detectar polipéptidos HA implican proporcionar una muestra patológica y/o ambiental, poniendo en contacto la muestra con un agente de unión a polipéptido HA y determinar si el agente de unión a polipéptido HA se une con la muestra en relación con un agente de unión de control negativo. En algunas realizaciones, dichos métodos implican una etapa de procesar la muestra (por ejemplo, someter la muestra a una o más etapas de purificación) antes de la etapa de contacto. En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA proporcionado se marcan con un resto detectable (por ejemplo, marcador fluorescente, radiactivo, quimioluminiscente, etc.). En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA son detectables mediante métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia de western, ELISA, inmunofluorescencia, etc.). En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA se inmovilizan (por ejemplo, en una perla, en una placa de microtitulación, en una matriz, en una matriz de glicanos, etc.) antes de la etapa de contacto.

En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA son o comprenden glicanos de topología de tipo sombrilla (incluyendo miméticos de glicanos de topología de tipo sombrilla). En dichas realizaciones, se inmovilizan glicanos en matrices de glicanos, y la etapa de contacto implica incubar la matriz de glicano con la muestra.

En algunas realizaciones, los agentes de unión a polipéptido HA son o comprenden anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo, como se describe en el presente documento). En dichas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan en perlas, y la etapa de contacto implica realizar una inmunoprecipitación.

También pueden usarse anticuerpos que se unen con polipéptidos HA en ensayos de neutralización de virus, en los que una muestra se trata con anticuerpo específico para polipéptidos HA de interés, y se ensaya con respecto a su capacidad para infectar células cultivadas en relación con una muestra no tratada. Si el virus en esa muestra contiene dichos polipéptidos HA, el anticuerpo neutralizará el virus y evitará que infecte las células cultivadas. Como alternativa o adicionalmente, dichos anticuerpos pueden usarse también en ensayos de inhibición de HA, en los que la proteína HA se aísla de una muestra dada, tratada con anticuerpo específico para un polipéptido HA o conjunto de polipéptidos HA particulares, y se ensaya con respecto a su capacidad para aglutinar eritrocitos en relación con la muestra no tratada. Si el virus de la muestra contiene dicho polipéptido HA, el anticuerpo neutralizará la actividad del polipéptido HA y evitará que aglutine eritrocitos (Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL Press, 1988; www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html; www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html).

En algunas realizaciones, dichos agentes pueden incluir ácidos nucleicos que se unen específicamente con nucleótidos que codifican polipéptidos HA particulares y que pueden usarse para detectar específicamente dichos polipéptidos HA por RT-PCR o hibridación *in situ* (www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html; www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html). En ciertas realizaciones, se amplifican ácidos nucleicos que se han aislado de una muestra antes de la detección. En ciertas realizaciones, pueden marcarse de forma detectable reactivos de diagnóstico.

Kits

La presente invención proporciona kits que contienen reactivos útiles para llevar a cabo métodos terapéuticos, profilácticos y/o diagnósticos de acuerdo con la invención. Los contenidos de los kits incluyen, pero sin limitación, polipéptidos HA, agentes de unión a polipéptidos HA, agentes de interferencia con polipéptidos HA, fragmentos de los mismos, variantes de los mismos y/o partes características de los mismos. Los kits pueden incluir ácidos nucleicos (por ejemplo, plásmidos de expresión) que codifican polipéptidos HA, agentes de unión a polipéptidos HA, agentes de interferencia con polipéptidos HA, fragmentos de los mismos, variantes de los mismos y/o partes características de los mismos. También pueden incluirse líneas celulares de mamífero con los kits, incluyendo pero sin limitación, líneas celulares Vero y MDCK.

En ciertas realizaciones, los kits para uso de acuerdo con la presente invención pueden incluir una muestra de referencia, instrucciones para procesar muestras, realizar el ensayo, instrucciones para interpretar los resultados, tampones y/u otros reactivos necesarios para realizar el ensayo. En ciertas realizaciones, el kit puede comprender un panel de anticuerpos.

En algunas realizaciones de la presente invención, pueden utilizarse matrices de glicanos, como se analizan posteriormente, como diagnóstico y/o kits.

En ciertas realizaciones se usan matrices de glicanos y/o kits para realizar estudios de respuesta a dosis para evaluar la unión de polipéptidos HA con glicanos de tipo sombrilla a múltiples dosis (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Dichos estudios proporcionan información particularmente valiosa acerca de las características de unión de polipéptidos HA ensayados, y son particularmente útiles para evaluar la unión específica. Los estudios de unión de respuesta a dosis de este tipo encuentran muchas aplicaciones útiles. Para proporcionar solamente un ejemplo, pueden ser útiles el seguimiento de la evolución de características de unión en una serie relacionada de variantes de polipéptidos HA, si la serie se genera mediante evolución natural, modificación por ingeniería genética intencionada o una combinación de las dos.

En ciertas realizaciones, se usan matrices de glicanos y/o kits para inducir, identificar y/o seleccionar agentes de unión (por ejemplo, polipéptidos HA y/o variantes de polipéptidos HA) que tienen características de unión deseadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usan matrices de glicanos y/o kits para ejercer presión evolutiva (por ejemplo, exploración y/o selección) en una población de agentes de unión a polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos HA).

En algunas realizaciones, los kits contienen instrucciones para su uso.

35 *Matrices de Glicano*

Para expandir rápidamente el conocimiento actual de interacciones de glicano-proteínas de unión a glicano (GBP) específicas conocidas, el Consortium of Functional Glycomics (CFG; www.functionalglycomics.org) una iniciativa de investigación colaborativa internacional, ha desarrollado matrices de glicanos que comprenden varias estructuras de glicanos que han permitido exploración de alto rendimiento de GBP para nuevas especificidades de ligando de glicanos. Las matrices de glicanos comprenden motivos de glicanos tanto monovalentes como polivalentes (es decir, unidos con cadena principal de poli(acrilamida), y cada matriz comprende 264 glicanos con concentraciones bajas (10 μM) y altas (100 μM), y seis puntos para cada concentración (véase <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh5.shtml>).

Las matrices comprenden predominantemente glicanos sintéticos que capturan la diversidad fisiológica de glicanos unidos a N y O. Además de los glicanos sintéticos, las mezclas de glicano unidas a N derivadas de glicoproteínas de mamífero diferentes también están representadas en la matriz.

Como se usa en el presente documento, una "matriz" de glicano se refiere a un conjunto de uno o más glicanos, opcionalmente inmovilizados en un soporte sólido. En algunas realizaciones, una "matriz" es una colección de glicanos presentes como una disposición organizada o patrón en dos o más localizaciones que están físicamente separadas en el espacio. Típicamente, una matriz de glicanos tendrá al menos 4, 8, 16, 24, 48, 96 o varios cientos o miles de localizaciones discretas. En general, las matrices de glicanos pueden tener cualquiera de una diversidad de formatos. Se conocen en la técnica diversos formatos de matrices diferentes aplicables a biomoléculas. Por ejemplo, se conoce bien un enorme número de matrices de proteínas y/o ácidos nucleicos. Los expertos habituales en la materia apreciarán inmediatamente formatos de matrices convencionales apropiados para matrices de glicanos de la presente invención.

En algunas realizaciones, las matrices de glicano están presentes en formatos de "micromatriz". Una micromatriz puede tener típicamente localizaciones de muestras separadas por una distancia de 50-200 micrómetros o menos y muestra inmovilizada en el intervalo nano a micromolar o en el intervalo nano a picogramo. Los formatos de matrices conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, en los que cada localización de muestra discreta tiene una escala de, por ejemplo, diez micrómetros.

65

- En algunas realizaciones, las matrices de glicanos comprenden una pluralidad de glicanos espacialmente inmovilizados en un soporte. La presente invención proporciona moléculas de glicanos dispuestas en un soporte. Como se usa en el presente documento, "soporte" se refiere a cualquier material que sea adecuado para usarse para disponer moléculas de glicanos. Como se apreciará por los expertos habituales en la materia, puede emplearse cualquiera de una amplia diversidad de materiales. Para proporcionar solamente algunos ejemplos, los materiales de soporte que pueden ser útiles en la invención incluyen membranas hidrófobas, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa, PVDF o nylon. Dichas membranas se conocen bien en la técnica y pueden obtenerse de, por ejemplo, Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido.
- En algunas realizaciones, el soporte en el que se disponen los glicanos puede comprender un óxido metálico. Los óxidos metálicos adecuados incluyen, pero sin limitación, óxido de titanio, óxido de tántalo y óxido de aluminio. Pueden obtenerse ejemplos de dichos materiales de Sigma-Aldrich Company Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset. BH12 4QH Reino Unido. En algunas realizaciones, dicho soporte es o comprende un gel de óxido metálico. En algunas realizaciones, dicho soporte es o comprende geles de sílice o geles de óxido de aluminio (pueden obtenerse ejemplos de dichos materiales de, por ejemplo, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- En algunas realizaciones de la invención, las matrices de glicanos se inmovilizan en un soporte que puede resistir el cambio de tamaño o forma durante su uso normal. Por ejemplo un soporte puede ser un portaobjetos de vidrio recubierto con un material componente adecuado para su uso para disponer glicanos. Además, algunos materiales compuestos pueden proporcionar convenientemente solidez a un soporte.
- Como se demuestra en el presente documento, las matrices son útiles para la identificación y/o caracterización de diferentes polipéptidos HA y sus características de unión. En ciertas realizaciones, se ensayan polipéptidos HA en dichas matrices para evaluar su capacidad para unirse con glicanos de topología de tipo sombrilla (por ejemplo, con glicanos α 2-6 sialilados, y particularmente con glicanos α 2-6 sialilados largos dispuestos en una topología de tipo sombrilla).
- De hecho, la presente invención proporciona matrices de agentes de unión a polipéptidos HA que son o comprenden uno o más de glicanos de topología de tipo sombrilla, miméticos de glicanos de topología de tipo sombrilla, glicanos α 2-6 sialilados, y glicanos α 2-3 sialilados, que pueden usarse para caracterizar capacidades de unión a polipéptidos HA y/o como un diagnóstico para detectar, por ejemplo, polipéptidos HA de unión a seres humanos (por ejemplo, polipéptidos HA de H1, como se han descrito anteriormente). Como resultará evidente para los expertos habituales en la materia, dichas matrices son útiles para caracterizar o detectar cualquier polipéptido HA, incluyendo, por ejemplo, los hallados en aislados de gripe naturales además de los diseñados y/o preparados por investigadores.
- En algunas realizaciones, dichas matrices incluyen glicanos representativos de aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más de los glicanos (por ejemplo, los glicanos de tipo sombrilla, que serán con frecuencia glicanos α 2-6 sialilados, particularmente glicanos α 2-6 sialilados largos) hallados en receptores de HA humanos y particularmente en receptores de HA del tracto respiratorio superior humano. En algunas realizaciones, las matrices incluyen algunas de o todas las estructuras de glicanos representadas en las Figuras 5-8. En algunas realizaciones, las matrices incluyen al menos aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más de estos glicanos representados.
- La presente invención proporciona métodos para identificar o caracterizar proteínas HA usando matrices de glicanos. En algunas realizaciones, por ejemplo, dichos métodos comprenden etapas de (1) proporcionar una muestra que contiene polipéptido HA, (2) poner en contacto la muestra con una matriz de glicanos que comprende, y (3) detectar la unión de polipéptido HA con uno o más glicanos en la matriz.
- Las fuentes adecuadas para muestras que contienen polipéptidos HA para poner en contacto con matrices de glicanos de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, muestras patológicas y/o muestras ambientales, tales como las descritas anteriormente.
- Se conoce en la técnica una amplia diversidad de sistemas de detección adecuados para ensayar la unión de polipéptidos HA con matrices de glicanos. Por ejemplo, los polipéptidos HA puede marcarse de forma detectable (directa o indirectamente) antes de o después de ponerse en contacto con la matriz; después puede detectarse la unión por detección de marcador localizado. En algunas realizaciones, pueden utilizarse dispositivos de exploración para examinar localizaciones particulares en una matriz.
- Como alternativa o adicionalmente, la unión con glicanos en matriz puede medirse usando, por ejemplo, sistemas de detección calorimétricos, de fluorescencia o radiactivos, u otros métodos de marcaje, u otros métodos que no requieran marcaje. En general, la detección fluorescente típicamente implica explorar directamente la matriz con una molécula fluorescente y supervisar las señales fluorescentes. Como alternativa o adicionalmente, las matrices pueden explorarse con una molécula que está marcada (por ejemplo, con biotina) para detección de fluorescencia indirecta (en este caso, ensayando con respecto a unión de estreptavidina marcada con fluorescencia). Como alternativa o adicionalmente, pueden utilizarse métodos de interrupción de fluorescencia en los que los glicanos en

matrices se marcan con fluorescencia y se exploran con una molécula de ensayo (que puede estar o no marcada con un fluoróforo diferente). En dichas realizaciones, la unión de la matriz actúa para silenciar la fluorescencia emitida del glicano en matriz, por lo tanto la unión se detecta por pérdida de emisión fluorescente. Como alternativa o adicionalmente, los glicanos en matrices pueden explorarse con una muestra de tejido vivo que se ha cultivado en presencia de una sustancia radiactiva, produciendo una sonda marcada radiactivamente. La unión en dichas realizaciones puede detectarse midiendo la emisión radiactiva.

Dichos métodos son útiles para determinar el hecho de la unión y/o el alcance de la unión por polipéptidos HA con matrices de glicanos. En algunas realizaciones de la invención, dichos métodos pueden usarse además para identificar y/o caracterizar agentes que interfieran con o alteren de otro modo las interacciones de glicano-polipéptido HA.

Los métodos descritos posteriormente pueden ser útiles para identificar si una molécula que se cree que es capaz de interactuar con un carbohidrato puede de hecho hacerlo, o identificar si una molécula tiene inesperadamente la capacidad de interactuar con un carbohidrato.

La presente invención proporciona métodos para usar matrices, por ejemplo, para detectar un agente particular en una muestra de ensayo. Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender las etapas de (1) poner en contacto una matriz de glicanos con una muestra de ensayo (por ejemplo, con una muestra que se cree que contiene un polipéptido HA, por ejemplo, un polipéptido HA de H1); y (2) detectar la unión de cualquier agente en la muestra de ensayo con la matriz.

Puede usarse unión con matrices, por ejemplo, para determinar la cinética de interacción entre el agente de unión y el glicano. Por ejemplo, los métodos para determinar la cinética de interacción pueden incluir las etapas de (1) poner en contacto una matriz de glicanos con la molécula que se ensaya; y (2) medir la cinética de interacción entre el agente de unión y un glicano o glicanos en matrices.

La cinética de interacción de un agente de unión con cualquiera de los glicanos en una matriz puede medirse por cambios en tiempo real en, por ejemplo, las señales colorimétricas o fluorescentes, como se ha detallado anteriormente. Dichos métodos pueden ser de uso particular en, por ejemplo, la determinación de si un agente de unión particular es capaz de interactuar con un carbohidrato específico con un mayor grado de unión que con el que lo hace un agente de unión diferente que interacciona con el mismo carbohidrato.

Se apreciará, por supuesto, que la unión de glicano con polipéptidos HA puede evaluarse en muestras de glicano o fuentes no presentes en un formato de matriz en sí mismo. Por ejemplo, los polipéptidos HA pueden unirse con muestras tisulares y/o líneas celulares para evaluar sus características de unión a glicanos. Las líneas celulares apropiadas incluyen, por ejemplo, cualquiera de una diversidad de líneas celulares de mamífero, particularmente las que expresan receptores de HA que contienen glicanos de topología de tipo sombrilla (por ejemplo, al menos algunos de los cuales pueden ser glicanos α 2-6 sialilados y particularmente glicanos α 2-6 sialilados largos). En algunas realizaciones, las líneas celulares utilizadas expresan glicanos individuales con topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, las líneas celulares utilizadas expresan una diversidad de glicanos. En algunas realizaciones, se obtienen líneas celulares de aislados clínicos; en algunos se mantienen o manipulan para tener una distribución y/o prevalencia de glicanos deseada. En algunas realizaciones, las muestras tisulares y/o líneas celulares expresan glicanos característicos de estas células epiteliales respiratorias superiores de mamífero.

Tratamiento

La presente invención proporciona sistemas, composiciones y métodos para tratar (por ejemplo, aliviar, mejorar, mitigar, retardar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de) y/o prevenir la infección por gripe. En algunas realizaciones, pueden usarse agentes de interferencia y/o agentes de unión tales como los descritos en el presente documento para una diversidad de fines terapéuticos, por ejemplo, tratar la infección por gripe y/o desarrollar vacunas para inmunizar a sujetos contra la infección por gripe.

La presente invención abarca el reconocimiento de que las vacunas y/o los productos terapéuticos que previenen, retardan la aparición de y/o o tratan con éxito la infección con cepa de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/Iowa/15/1930 pueden prevenir, retardar la aparición de y/o tratar con éxito la infección con la cepa de gripe 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). Las vacunas y/o los productos terapéuticos que previenen, retardan la aparición de y/o tratan con éxito la infección con la cepa de gripe 2009A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009) pueden prevenir, retardar la aparición de y/o tratar con éxito la infección con la cepa de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/Iowa/15/1930. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la vacuna y/o las composiciones terapéuticas (tales como las descritas en las secciones posteriores) comprenden una o más de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918, A/Swine/Iowa/15/1930 y/o 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las

composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden las cepas de gripe A/Swine/lowa/15/1930 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden la cepa de gripe A/South Carolina/1/1918. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden la cepa de gripe A/Swine/lowa/15/1930. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden la cepa de gripe 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009).

En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas (tales como las descritas en las secciones posteriores) comprenden uno o más polipéptidos HA de H1 presentes en una o más de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918, A/Swine/lowa/15/1930, y/o 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/lowa/15/1930. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 and 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de gripe A/Swine/lowa/15/1930 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden polipéptidos HA de H1 presentes en la cepa de gripe A/South Carolina/1/1918. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden polipéptidos HA de H1 presentes en la cepa de gripe A/Swine/lowa/15/1930. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna y/o terapéuticas comprenden polipéptidos HA de H1 presentes en la cepa de gripe 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009).

En algunas realizaciones, los métodos de vacunación y/o tratamiento (tales como los descritos en las secciones posteriores) implican la estratificación de una población de pacientes basándose en la exposición previa a cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930. Dichos métodos implican etapas de determinar si un paciente se ha expuesto previamente a una o ambas de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930. Puede usarse cualquiera de una diversidad de métodos para determinar si un individuo se ha expuesto previamente a una o ambas de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930. Para proporcionar solamente algunos ejemplos, pueden aislarse glóbulos blancos de un paciente y analizarse para determinar si está presente cualquier linfocito B 1918 y/o 1930 positivo. Como alternativa o adicionalmente, pueden utilizarse métodos epidemiológicos para determinar una probabilidad de que un paciente particular se haya expuesto o no a cepas 1918 y/o 1930.

En algunas realizaciones, si se determina que un paciente se ha expuesto previamente una o ambas cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930, ese paciente puede recibir dosis menos concentradas, menos potentes y/o menos frecuentes de vacunas y/o productos terapéuticos de 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). Si se determina que un paciente no se ha expuesto previamente a una o ambas de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930, ese paciente puede recibir dosis más concentradas, más potentes, y/o más frecuentes de vacunas y/o productos terapéuticos de 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009).

En algunas realizaciones, si se determina que un paciente se ha expuesto previamente a una o ambas de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930, ese paciente puede vacunarse usando una composición de vacuna que han demostrado protección contra A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930. En algunas realizaciones, si se determina que un paciente se ha expuesto previamente a una o ambas de las cepas de gripe A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930, ese paciente puede tratarse usando una composición terapéutica que ha demostrado efecto terapéutico contra A/South Carolina/1/1918 y/o A/Swine/lowa/15/1930.

A. Vacunación

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia y/o agentes de unión de acuerdo con la invención (por ejemplo, entidades que se unen a polipéptidos HA y/o fragmentos, variantes, y/o partes características de los mismos; entidades que se unen a glicanos de topología de tipo sombrilla) pueden utilizarse para aplicaciones profilácticas. En algunas realizaciones, las aplicaciones profilácticas implican sistemas y métodos para prevenir, inhibir la progresión de, y/o retrasar el inicio de la infección gripal.

En algunas realizaciones, se usan vacunas de la gripe para prevenir y/o retrasar el inicio de la infección por gripe. En algunas realizaciones, la vacunación está adaptada a un polipéptido HA particular. Por ejemplo, las composiciones de vacuna pueden comprender polipéptidos HA de H1 y/o variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos. En algunas realizaciones, es deseable que las composiciones de vacuna comprendan antígenos que tienen una conformación nativa, median en una respuesta protectora (por ejemplo, activación del complemento, neutralización de virus, etc.) y/o puedan inducir una fuerte respuesta de anticuerpos.

En algunas realizaciones, pueden utilizarse agentes de interferencia para inmunización pasiva (es decir, inmunización en la que se administran anticuerpos a un sujeto). En algunas realizaciones, las vacunas de la gripe para inmunización pasiva pueden comprender agentes de interferencia de anticuerpos, tales como los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, se produce inmunización pasiva cuando se transfieren anticuerpos de la madre al feto durante el embarazo. En algunas realizaciones, los anticuerpos se administran directamente a un individuo (por ejemplo, por inyección, por vía oral, etc.).

La presente invención proporciona vacunas de la gripe para inmunización activa (es decir, inmunización en la que se administran microbios, proteínas, péptidos, epítetos, mimótopos, etc. a un sujeto). En algunas realizaciones, las vacunas de la gripe pueden comprender uno o más agentes de interferencia y/o agentes de unión, como se describe en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos), por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos HA, variantes, fragmentos, partes características y/o combinaciones de los mismos descritos en el presente documento (por ejemplo, en la sección titulada "polipéptidos HA"). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden polipéptidos HA de H1 (y/o variantes, fragmentos y/o partes características de los mismos). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden polipéptidos HA de H1 que tienen una o más de las siguientes mutaciones Ile219Lys, Ser186Pro, Ala189Thr y/o Glu227Ala. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden polipéptidos HA de H1 que tienen una mutación Ile219Lys. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden polipéptidos HA de H1 que tienen una mutación en la posición de aminoácido 219 (por ejemplo, Ile219Lys) y al menos una sustitución de aminoácidos adicional en una posición de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 98, 136, 137, 138, 145, 153, 155, 156, 159, 183, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 215, 219, 222, 225, 226, 227 y 228. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden polipéptidos HA de H1 que tienen mutaciones Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden polipéptidos HA de H1 que tienen mutaciones en las posiciones de aminoácidos 186, 189 y 227 (por ejemplo, Ser186Pro, Ala189Thr y Glu227Ala) y al menos una sustitución de aminoácidos adicional en una posición de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 98, 136, 137, 138, 145, 153, 155, 156, 159, 183, 186, 187, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 215, 219, 222, 225, 226, 227 y 228. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden partículas de virus activos vivos que comprenden uno o más de cualquiera de los polipéptidos HA de H1 descritos en el presente documento, partículas de virus atenuados vivos que comprenden uno o más de cualquiera de los polipéptidos HA de H1 descritos en el presente documento, partículas similares a virus (VLP) que comprenden uno o más de cualquiera de los polipéptidos HA de H1 descritos en el presente documento, vacunas de subunidad que comprenden uno o más de cualquiera de los polipéptidos HA de H1 descritos en el presente documento y/o combinaciones de los mismos.

10 En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y al menos una de las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918, A/Swine/Iowa/15/1930, y/o 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y las cepas de la gripe A/Swine/Iowa/15/1930 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y la cepa de la gripe A/South Carolina/1/1918. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y la cepa de la gripe A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y la cepa de la gripe 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009).

15 En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y al menos un polipéptido HA de H1 presente en al menos una de las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918, A/Swine/Iowa/15/1930 y/o 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de la gripe A/South Carolina/1/1918 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y polipéptidos HA de H1 presentes en las cepas de la gripe A/Swine/Iowa/15/1930 y 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y polipéptidos HA de H1 presentes en la cepa de la gripe A/South Carolina/1/1918. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y polipéptidos HA de H1 presentes en la cepa de la gripe A/Swine/Iowa/15/1930. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden al menos un polipéptido HA (y/o variantes, fragmentos y/o partes características del mismo) y polipéptidos HA de H1 presentes en la cepa de la gripe 2009 A/H1N1 (por ejemplo, A/CA/4/2009).

20 En algunas realizaciones, una composición de vacuna comprende al menos un adyuvante. De acuerdo con la presente invención puede usarse cualquier adyuvante. Se conoce un gran número de adyuvantes; los Institutos Nacionales de la Salud preparan un compendio útil de muchos de estos compuestos y pueden encontrarse en internet (www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf). Véase también Allison (1998, Dev. Biol. Stand., 92: 3-11; incorporado en el presente documento por referencia), Unkeless *et al.* (1998, Annu. Rev. Immunol., 6:251-281;

incorporado en el presente documento por referencia), y Phillips *et al.* (1992, *Vaccine*, 10:151-158; incorporado en el presente documento por referencia). En la técnica se conocen cientos de adyuvantes diferentes y podrían emplearse en la práctica de la presente invención. Los adyuvantes ejemplares que pueden utilizarse de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, citocinas, sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc.; Baylor *et al.*, *Vaccine*, 20:S18, 2002; incorporado en el presente documento por referencia), adyuvantes de tipo gel (por ejemplo, fosfato de calcio, etc.); adyuvantes microbianos (por ejemplo, secuencias de ADN inmunomoduladoras que incluyen motivos CpG; endotoxinas tales como monofosforil lípido A (Ribi *et al.*, 1986, *Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986; incorporado en el presente documento por referencia); exotoxinas tales como toxina colérica, toxina termolábil de *E. coli*, y toxina pertussis; muramil dipéptido, etc.); adyuvantes de emulsión en aceite y basados en emulsionantes (por ejemplo, Adyuvante de Freund, MF59 [Novartis], SAF, etc.); adyuvantes en forma de partículas (por ejemplo, liposomas, microesferas biodegradables, etc.); adyuvantes sintéticos (por ejemplo, copolímeros de bloque no iónicos, análogos de muramil péptidos, polifosfazeno, polinucleótidos sintéticos, etc.); y/o combinaciones de los mismos. Otros adyuvantes ejemplares incluyen algunos polímeros (por ejemplo, polifosfazenos; descritos en la Patente de Estados Unidos 5.500.161, que se incorpora en el presente documento por referencia), Q57, saponinas (por ejemplo, QS21, Ghochikyan *et al.*, *Vaccine*, 24: 2275, 2006; incorporado en el presente documento por referencia), escualeno, tetraclorodecaóxido, CPG 7909 (Cooper *et al.*, *Vaccine*, 22: 3136, 2004; incorporado en el presente documento por referencia), poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno] (PCCP; Payne *et al.*, *Vaccine*, 16: 92, 1998; incorporado en el presente documento por referencia), interferón- γ (Cao *et al.*, *Vaccine*, 10: 238, 1992; incorporado en el presente documento por referencia), copolímero en bloque P1205 (CRL1005; Katz *et al.*, *Vaccine*, 18: 2177, 2000; incorporado en el presente documento por referencia), interleucina-2 (IL-2; Mbwuiké *et al.*, *Vaccine*, 8: 347, 1990; incorporado en el presente documento por referencia), polimetil metacrilato (PMMA; Kreuter *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 70: 367, 1981; incorporado en el presente documento por referencia), etc.

25 B. Terapia

La presente invención proporciona sistemas y métodos para tratar a pacientes que padecen, son susceptibles de y/o presentan síntomas de infección gripal. En algunas realizaciones, la invención proporciona sistemas y métodos útiles para estratificar a los pacientes que padecen, son susceptibles de y/o presentan síntomas de infección gripal.

En algunas realizaciones, pueden utilizarse agentes de interferencia y/o agentes de unión de acuerdo con la invención (por ejemplo, entidades que se unen a polipéptidos HA y/o fragmentos, variantes y/o partes características de los mismos; entidades que se unen a glicanos con topología de tipo sombrilla) para aplicaciones terapéuticas.

En algunas realizaciones, las aplicaciones terapéuticas comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente de interferencia y/o agente de unión de acuerdo con la invención a un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión a un sujeto puede aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más signos, síntomas y/o características de la infección gripal.

En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión reduce el nivel de viriones de gripe circulantes en un sujeto (por ejemplo, viriones de gripe que tienen capacidad de infectar nuevas células). En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión reduce el nivel de viriones de gripe circulantes en un sujeto en aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % con respecto a los controles no tratados.

En algunas realizaciones, los agentes de interferencia y/o agentes de unión pueden usarse *in vitro* para reducir la carga viral en un sujeto. Para reducir la carga viral de un componente corporal, particularmente un componente corporal de un paciente infectado con gripe, se pasa sangre del paciente a través de un dispositivo que comprende agentes de interferencia y/o agentes de unión unidos a una superficie o soporte sólido para capturar viriones de la gripe (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Números 5.698.390 y 4.692.411; ambas incorporadas en el presente documento por referencia). Pueden usarse otros diversos dispositivos encontrados en la bibliografía con los presentes anticuerpos para conseguir un resultado similar. Un componente corporal puede ser un fluido biológico (por ejemplo, sangre, suero, etc.), un tejido, un órgano, tal como el hígado, y similares.

En algunas realizaciones, el "nivel de viriones de la gripe circulantes en un sujeto" se refiere a un número absoluto de viriones que circulan en un sujeto. En algunas realizaciones, el "nivel de viriones de la gripe circulantes en un sujeto" se refiere a un número de viriones por unidad de volumen (por ejemplo, mililitro, litro, etc.) de sangre del sujeto. En algunas realizaciones, el "nivel de viriones de la gripe circulantes en un sujeto" se refiere a la carga viral.

En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión inhibe la unión de virus a los receptores de HA. En algunas realizaciones, la administración de interferencia y/o agentes de unión inhibe la unión de virus a al menos un receptor de HA aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 50 veces,

aproximadamente 100 veces, aproximadamente 500 veces, aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces o más de aproximadamente 10.000 veces con respecto a los controles no tratados.

5 En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión destruye y/o inactiva los viriones de la gripe en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración de anticuerpos de gripe destruye y/o inactiva aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 % de los viriones de la gripe en un sujeto con respecto a los controles no tratados.

10 En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o de agentes de unión inhibe la fusión mediada por virus con una célula diana. En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión inhibe la fusión mediada por virus con una célula diana aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 500 veces, aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces o más de aproximadamente 10.000 veces con respecto a los controles no tratados.

20 En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión inhibe cambios conformacionales de una o más proteínas asociadas con la entrada del virus. En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión inhibe cambios conformacionales de una o más proteínas asociadas con la entrada de virus aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 500 veces, aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 10.000 veces o más de aproximadamente 10.000 veces con respecto a los controles no tratados.

25 En algunas realizaciones, la administración de agentes de interferencia y/o agentes de unión produce cambios conformacionales en polipéptidos HA y/o receptores de HA. Por ejemplo, los agentes de interferencia y/o agentes de unión administrados pueden unirse a polipéptidos HA y/o receptores de HA, bloqueando de esta manera estéricamente la capacidad de los polipéptidos HA y/o los receptores de HA de reconocerse y/o interactuar entre sí. En algunas realizaciones, los agentes de interferencia y/o agentes de unión administrados pueden unirse a polipéptidos HA y/o receptores de HA, cambiando de esta manera la conformación tridimensional de los polipéptidos HA y/o receptores de HA de tal forma que los polipéptidos HA y receptores de HA se vuelven incapaces de reconocerse entre sí.

35 En algunas realizaciones, los regímenes de tratamiento/vacunación se adaptan particularmente para el individuo que se está tratando y/o vacunando. Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona sistemas, composiciones y métodos útiles para determinar si un paciente está infectado con gripe HA de H1 o con gripe que no es HA de H1. Dichos métodos pueden utilizarse para estratificar pacientes en categorías de tratamiento y/o vacunación. En algunas realizaciones, dichos métodos pueden ser ventajosos porque el tratamiento y/o vacunación se adapta al individuo particular que se está tratando y/o vacunando. Por citar solo un ejemplo particular, si un paciente se clasifica como un paciente infectado con gripe HA de H1, al paciente se le pueden administrar terapias que son útiles para el tratamiento de la gripe HA de H1, y no se le administrarán terapias que no son útiles para el tratamiento de la gripe HA de H1. Esto evita o reduce el riesgo de reacciones adversas debidas a la administración de agentes terapéuticos que no son necesarios. Dichos métodos eliminan el gasto de tratar y/o vacunar a pacientes que no se beneficiarían de dicho tratamiento y/o vacunación.

C. Composiciones Farmacéuticas

50 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen agentes de interferencia y/o agentes de unión, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, en las composiciones farmacéuticas se incluyen agente de interferencia y/o polipéptidos de agente de unión (por ejemplo, polipéptidos HA, polipéptidos que se unen a polipéptidos HA, variantes de los mismos y/o fragmentos de los mismos), ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, fragmentos característicos o biológicamente activos de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos, anticuerpos que se unen y/o compiten con dichos polipéptidos o fragmentos, moléculas pequeñas que interactúan o compiten con dichos polipéptidos o con glicanos que se unen a ellos, etc. En algunas realizaciones, en las composiciones farmacéuticas se incluyen agentes de interferencia y/o agentes de unión que no son polipéptidos, por ejemplo, que son moléculas pequeñas, glicanos de topología de tipo sombrilla y miméticos de los mismos, carbohidratos, aptámeros, polímeros, ácidos nucleicos, etc.

60 La invención incluye el tratamiento y/o profilaxis de infecciones gripales mediante la administración de dichas composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto que padece o es susceptible de padecer una infección gripal. En algunas realizaciones, se considera que un sujeto padece una infección gripal si el sujeto presenta uno o más síntomas asociados comúnmente con la infección gripal. En algunas realizaciones, se sabe o se cree que el sujeto ha estado expuesto al virus de la gripe. En algunas realizaciones, se considera que un sujeto es susceptible de padecer una infección gripal si se sabe o se cree que el

sujeto ha estado expuesto al virus de la gripe. En algunas realizaciones, se sabe o se cree que un sujeto ha estado expuesto al virus de la gripe si el sujeto ha estado en contacto con otros individuos que se sabe o se sospecha que se han infectado con el virus de la gripe y/o si el sujeto está o ha estado presente en un sitio en el que se sabe o se cree que es prevalente la infección gripal.

En algunas realizaciones, en los sujetos que padecen o son susceptibles de infección gripal se ensayan anticuerpos que reconocen polipéptidos HA antes, durante o después de la administración de las composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, a los sujetos que tienen dichos anticuerpos no se le administran composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos HA. En algunas realizaciones, se selecciona una dosis apropiada de composición farmacéutica y/o agente de unión basándose en la detección (o ausencia) de dichos anticuerpos.

En algunas realizaciones, la selección de un sujeto particular para el tratamiento y/o vacunación, agente de unión particular o composición para administración, y/o dosis o régimen particular para administración, se memoriza, por ejemplo, en una forma por escrito, impresa o una forma de almacenamiento electrónica.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse antes o después de que se desarrollen uno o más síntomas de la infección gripal.

La presente invención incluye el tratamiento y/o prevención (por ejemplo vacunación) de infecciones gripales mediante la administración de polipéptidos HA, agentes de interferencia y/o agentes de unión descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el tratamiento de las infecciones gripales de acuerdo con la presente invención se realiza mediante la administración de una vacuna. Hasta la fecha, aunque se han conseguido logros significativos en el desarrollo de vacunas de la gripe, sigue habiendo espacio para mejoras adicionales. La presente invención proporciona vacunas que comprenden polipéptidos HA, agentes de interferencia y/o agentes de unión. Por citar solo algunos ejemplos, las vacunas pueden comprender agentes de interferencia que se unen a glicanos de tipo sombrilla (por ejemplo, glicanos de tipo sombrilla unidos por enlaces α 2-6 tales como, por ejemplo, glicanos α 2-6 sialilados largos), agentes de unión que se unen a polipéptidos HA y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una composición carece sustancialmente de agentes que se unen preferentemente a glicanos que no tienen topología de tipo sombrilla. En algunas de estas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen no más de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % de un agente que se une a glicanos del receptor de HA distintos de glicanos con topología de tipo sombrilla.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona vacunas y la administración de estas vacunas a un ser humano (por ejemplo, a un individuo que padece o es susceptible de padecer una infección gripal). En ciertas realizaciones, las vacunas son composiciones que comprenden uno o más de los siguientes: (1) virus inactivado, (2) virus de la gripe atenuado vivo, por ejemplo, virus con defectos de replicación, (3) agentes de interferencia (por ejemplo, polipéptidos HA), LSBA, UTBA, UTBSA, etc.), (4) ácido nucleico que codifica polipéptidos de agente interferente (por ejemplo, polipéptidos HA) y/o partes características o biológicamente activas de los mismos, (5) vector de ADN que codifica un polipéptido de agente interferente (por ejemplo, polipéptido HA) o parte característica o biológicamente activa del mismo, (6) agentes de unión (por ejemplo, entidades que se unen a polipéptidos HA), (7) ácido nucleico que codifica polipéptidos de agente de unión y/o partes características o biológicamente activas de los mismos, (8) vector de ADN que codifica un polipéptido de agente de unión y/o parte característica o biológicamente activa del mismo, (9) sistema de expresión, por ejemplo, células que expresan uno o más polipéptidos HA que se usarán como antígenos, y/o (10) partículas similares a virus.

De esta manera, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona vacunas de la gripe inactivadas. En ciertas realizaciones, las vacunas de la gripe inactivadas comprenden uno de tres tipos de preparación antigénica: virus enteros inactivados, subviriones en los que partículas de virus purificadas se rompen con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envuelta lipídica (vacuna "fraccionada") o polipéptido HA purificado (vacuna de "subunidad"). En ciertas realizaciones, el virus puede inactivarse por tratamiento con formaldehído, beta-propiolactona, éter, éter con detergente (tal como TWEEN-80), bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y Triton N101, desoxicolato sódico y tri(n-butil) fosfato. La inactivación puede realizarse antes o después de la clarificación del fluido alantoideo (a partir de virus producidos en huevos); los viriones se aíslan y purifican por centrifugación (Nicholson *et al.*, eds., Textbook of Influenza, Blackwell Science, Malden, MA, 1998; incorporado en el presente documento por referencia). Para evaluar la potencia de la vacuna, puede usarse el ensayo de inmunodifusión radial simple (SRD) (Schild *et al.*, Bull. World Health Organ., 52: 43-50 & 223-31, 1975; Mostow *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2: 531, 1975; incorporado en el presente documento por referencia).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona partículas similares a virus (VLP) que son útiles para vacunas. En general, las VLP comprenden múltiples copias de un antígeno proteico que, cuando se ensamblan entre sí, imitan la conformación de un virus nativo. En algunas realizaciones, las VLP contienen presentaciones de alta densidad repetitivas de proteínas de la superficie del virus de la gripe (por ejemplo, polipéptidos HA de acuerdo con la presente invención) que presentan epítomos conformacionales que pueden desencadenar respuestas inmunitarias fuertes de linfocitos T y/o linfocitos B. Como las VLP no contienen ningún material genético viral, pueden ser más seguras que los virus atenuados en las composiciones de vacuna. Las VLP pueden producirse en una diversidad de sistemas de cultivos celulares incluyendo líneas celulares de mamífero, líneas celulares de

insecto, levaduras, células vegetales, etc. Como análisis general de VLP, véase, por ejemplo, las solicitudes PCT publicadas WO 02/000885, WO 05/020889, WO 06/108226, WO 07/130327, WO 07/130330, WO 08/005777, WO 08/040060, WO 08/054535, WO 08/061243, WO 08/094197, WO 08/094200, WO 08/148104, WO 09/009876, WO 09/012489, WO 10/006452 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0009008, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia.

En algunas realizaciones, una VLP de acuerdo con la invención es una VLP especializada denominada lipopartícula. En general, las lipopartículas son VLP estables, altamente purificadas y homogéneas que están modificadas por ingeniería genética para contener altas concentraciones de una proteína de la membrana conformacionalmente intacta de interés. En algunas realizaciones, las lipopartículas de acuerdo con la presente invención contienen proteínas de la envuelta del virus de la gripe y/u otros antígenos de la gripe.

La presente invención también proporciona vacunas de la gripe atenuadas vivas, y en la técnica se conocen bien métodos para la atenuación. En ciertas realizaciones, la atenuación se consigue mediante el uso de genética inversa, tal como mutagénesis dirigida.

En algunas realizaciones, el virus de la gripe para uso en vacunas se desarrolla en huevos, por ejemplo, en huevos de gallina con embrión, en cuyo caso el material recogido es el fluido alantoideo. Como alternativa o adicionalmente, el virus de la gripe puede obtenerse por cualquier método usando cultivos de tejidos para desarrollar el virus. Los sustratos celulares adecuados para desarrollar el virus incluyen, por ejemplo, células de riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células de tipo MDCK, células de riñón de mono tales como células AGMK incluyendo células Vero, células epiteliales cultivadas como líneas celulares continuas, células 293T, células BK-21, células CV-1 o cualquier otro tipo celular de mamífero adecuado para la producción de virus de la gripe (incluyendo células epiteliales de las vías respiratorias superiores) para formar vacunas, fácilmente adquiribles en fuentes comerciales (por ejemplo ATCC, Rockville, Md.). Los sustratos celulares adecuados también incluyen células humanas tales como células MRC-5. Los sustratos celulares adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo, también se incluyen células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo.

En algunas realizaciones, las vacunas además comprenden uno o más adyuvantes. De acuerdo con la presente invención puede usarse cualquier adyuvante. Se conoce un gran número de adyuvantes; los Institutos Nacionales de la Salud preparan un compendio útil de muchos de estos compuestos y pueden encontrarse en Internet (www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf). Véase también Allison (1998, Dev. Biol. Startd., 92: 3-11; incorporado en el presente documento por referencia), Unkeless *et al.* (1998, Annu. Rev. Immunol., 6: 251-281; incorporado en el presente documento por referencia) y Phillips *et al.* (1992, Vaccine, 10: 151-158; incorporado en el presente documento por referencia). En la técnica se conocen cientos de adyuvantes diferentes y puede emplearse en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, en vacunas humanas pueden usarse como adyuvantes sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Baylor *et al.*, Vaccine, 20: S18, 2002) y monofosforil lípido A (MPL; Ribi *et al.*, 1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986). Como alternativa o adicionalmente, los adyuvantes ejemplares que pueden utilizarse de acuerdo con la invención incluyen citocinas, fosfato de calcio, adyuvantes microbianos (por ejemplo, secuencias de ADN inmunomoduladoras que incluyen motivos CpG; endotoxinas tales como monofosforil lípido A (Ribi *et al.*, 1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p 407, 1986; incorporado en el presente documento por referencia); exotoxinas tales como toxina colérica, toxina termolábil de *E. coli* y toxina pertussis; muramil dipéptido, etc.); adyuvantes de emulsión en aceite y basados en emulsionantes (por ejemplo Adyuvante de Freund, SAF, etc.); adyuvantes en forma de partículas (por ejemplo, liposomas, microesferas biodegradables, etc.); adyuvantes sintéticos (por ejemplo, copolímeros de bloque no iónicos, análogos de muramil péptido, polifosfaceno, polinucleótidos sintéticos, etc.); polímeros (por ejemplo, polifosfacenos; descritos en la Patente de Estados Unidos 5.500.161, que se incorporan en el presente documento por referencia), Q57, escualeno y/o tetraclorodecaóxido.

Como alternativa o adicionalmente, actualmente se están ensayando nuevos compuestos como adyuvantes en vacunas humanas, tales como MF59 (Chiron Corp., <http://www.chiron.com/investors/pressreleases/2005/051028.html>), CPG 7909 (Cooper *et al.*, Vaccine, 22: 3136, 2004; incorporado en el presente documento por referencia) y saponinas, tales como QS21 (Ghochikyan *et al.*, Vaccine, 24: 2275, 2006; incorporado en el presente documento por referencia).

Además, en la técnica se conocen algunos adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de vacunas de la gripe, tales como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] (PCCP; Payne *et al.*, Vaccine, 16: 92, 1998; incorporado en el presente documento por referencia), interferón- γ (Cao *et al.*, Vaccine, 10: 238, 1992; incorporado en el presente documento por referencia), copolímero de bloque P1205 (CRL1005; Katz *et al.*, Vaccine, 18: 2177, 2000; incorporado en el presente documento por referencia), interleucina-2 (IL-2; Mbwike *et al.*, Vaccine, 8: 347, 1990; incorporado en el presente documento por referencia) y polimetil metacrilato (PMMA; Kreuter *et al.*, J. Pharm. Sci., 70: 367, 1981; incorporado en el presente documento por referencia).

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas no incluyen adyuvantes (por ejemplo, las composiciones proporcionadas carecen básicamente de adyuvantes). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas

no incluyen un adyuvante de alumbre (por ejemplo, las composiciones proporcionadas carecen básicamente de alumbre).

5 La presente invención proporciona otras composiciones terapéuticas útiles en el tratamiento y/o vacunación de infecciones virales. En algunas realizaciones, el tratamiento y/o vacunación se realiza mediante la administración de un agente que interfiere con la expresión o actividad de un polipéptido HA.

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos u otros agentes relacionados con polipéptidos, agentes de interferencia y/o agentes de unión proporcionados. Por ejemplo, la invención proporciona composiciones que contienen anticuerpos que reconocen partículas de virus que contienen un polipéptido HA particular (por ejemplo, un polipéptido HA que se une a glicanos de tipo sombrilla), ácidos nucleicos (tales como secuencias de ácido nucleico complementarias a secuencias de HA, que pueden usarse para ARNi), glicanos que compiten por la unión a receptores de HA, moléculas pequeñas o glicomiméticos que compiten por la interacción glicano-polipéptido HA, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se utilizan colecciones de diferentes agentes que tienen diversas estructuras. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas comprenden uno o más agentes multivalentes. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración urgente poco después de la exposición o de la sospecha de exposición.

20 En general, una composición farmacéutica incluirá un agente terapéutico además de uno o más agentes inactivos tales como solución estéril, vehículo compatible incluyendo, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, solución salina tamponada o solución de dextrosa. Como alternativa o adicionalmente, una composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes disgregantes, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes, aglutinantes sólidos, agentes de granulación, lubricantes, agentes colorantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes de perfume y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; incorporado en el presente documento por referencia) desvela diversos excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en el caso de que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como por medio de la producción de cualquier efecto biológico indeseable o la interacción de otra manera de una forma perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de la presente invención.

35 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica incluirá un agente terapéutico que está encapsulado, atrapado o unido dentro de una vesícula lipídica, una matriz biodisponible y/o biocompatible y/o biodegradable, u otra micropartícula.

40 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada incluirá un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión que no está agregado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, está presente en un agregado menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 % o 30 %, en peso seco o número, de un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión.

45 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada incluirá un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión que no está desnaturalizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, está desnaturalizado menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 % o 30 %, en peso seco o número, de un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión administrado.

50 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada incluirá un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión que no es inactivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, es inactivo menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 % o 30 %, en peso seco o número, de un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión administrado.

55 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para reducir la inmunogenicidad del polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión proporcionado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión proporcionado está asociado con (por ejemplo unido a) un agente, tal como polietilenglicol y/o carboximetilcelulosa, que enmascara su inmunogenicidad. En algunas realizaciones, un polipéptido HA, agente de interferencia y/o agente de unión proporcionado tiene una glicosilación adicional que reduce la inmunogenicidad.

60 Las formas de dosificación líquidas para administración oral y parenteral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de principios activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo,

propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de germen, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Aparte de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, saporíferos y/o agentes de perfume. En ciertas realizaciones para administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como CREMOPHOR[®], alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros y/o combinaciones de los mismos.

Las composiciones para administración rectal o vaginal típicamente son supositorios que pueden prepararse mezclando composiciones con excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidas a temperatura ambiente pero líquidas a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el principio activo.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el principio activo está mezclado con al menos un excipiente inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cargas o extensores (por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga), humectantes (por ejemplo, glicerol), agentes disgregantes (por ejemplo, agar, carbonato cálcico, almidón de patata, almidón de tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato sódico), agentes para retrasar la solución (por ejemplo parafina), aceleradores de la absorción (por ejemplo compuestos de amonio cuaternario), agentes humectantes (por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), absorbentes (por ejemplo, caolín y arcilla de bentonita) y lubricantes (por ejemplo talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico) y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes tamponantes.

Las formas de dosificación para administración tópica y/o transdérmica de un compuesto de acuerdo con la presente invención pueden incluir pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes y/o parches. En general, el principio activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante necesario y/o tampón que pueda requerirse. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que con frecuencia tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de un compuesto en el cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo y/o dosificando el compuesto en el medio apropiado. Como alternativa o adicionalmente, la velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad y/o dispersando el compuesto en una matriz polimérica y/o gel.

Pueden encontrarse consideraciones generales en la formulación y fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; incorporado en el presente documento por referencia.

La presente invención proporciona kits para la administración de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende al menos una dosis de un polipéptido HA, agente de unión de polipéptido HA, agente de interferencia de polipéptido HA, fragmento del mismo, variante del mismo y/o parte característica del mismo. En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende una dosis unitaria inicial y una dosis unitaria posterior de un agente de unión. En algunas de estas realizaciones, la dosis unitaria inicial es mayor que la dosis unitaria posterior o las dos dosis son iguales.

En algunas realizaciones, los kits comprenden al menos un componente de un dispositivo de liberación, por ejemplo un inhalador. En algunas de estas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende al menos un componente de un dispositivo de liberación, por ejemplo, un inhalador y una dosis de un polipéptido HA, agente de unión de polipéptido HA, agente de interferencia de polipéptido HA, fragmento del mismo, variante del mismo y/o parte característica del mismo. En algunas realizaciones, los kits comprenden instrucciones de uso.

55 D. Administración

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a cualquier sujeto (por ejemplo, cualquier animal) que lo necesite, incluyendo seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos que incluyen, pero sin limitación, vacunas y/o anticuerpos. Con la expresión "en combinación con" no se pretende dar a entender que los agentes tienen que administrarse al mismo tiempo o tienen que estar formulados para administrarse conjuntamente, aunque estos métodos de liberación están dentro del alcance de la invención. En general, cada agente se administrará a una dosis y en un programa de tiempos determinado para ese agente. Además, la invención incluye la liberación de las composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir o modificar su metabolismo, inhibir su excreción o modificar su distribución dentro del cuerpo. Aunque las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para el tratamiento y/o vacunación de

cualquier sujeto (por ejemplo, cualquier animal) que lo necesite, lo más preferido es que se usen en el tratamiento y/o vacunación de seres humanos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y/o agentes de unión se administran en combinación con uno o más de un agente antiviral (por ejemplo, Osetamivir [tamiflu], Zanamavir [Releza], etc.) y/o una sialidasa.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para el tratamiento y/o vacunación. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, y estado general del sujeto, la gravedad de la infección, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Las composiciones farmacéuticas típicamente se formulan en una
10 forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y permitir la uniformidad de la dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico a cargo del caso dentro del alcance de un criterio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto u organismo particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno que se esté tratando y/o frente al que se esté vacunando y la gravedad del trastorno; la actividad de la composición de vacuna específica empleada; la semivida de la composición después de la administración; la edad, peso corporal,
15 salud general, sexo y dieta del sujeto; el momento de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico empleado; y factores similares, bien conocidos en las técnicas médicas.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por una diversidad de vías, incluyendo la vía oral (PO), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea (SQ), intraventricular, transdérmica, interdérmica, intradérmica, rectal (PR), vaginal, intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), tópica (por ejemplo, mediante polvos, pomadas, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosa, intranasal, bucal, entérica, vítrea, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; como una pulverización oral, pulverización nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter en la vena porta.

30 En general, la vía de administración más apropiada dependerá de una diversidad de factores que incluyen la naturaleza del agente que se esté administrando (por ejemplo, su estabilidad después de la administración), el estado del sujeto (por ejemplo, si el sujeto puede tolerar un modo de administración particular), etc. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía intranasal. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por instilación intratraqueal. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por instilación bronquial. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como una pulverización nasal. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a través de la mucosa. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección intravenosa. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección intramuscular. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección subcutánea. En el momento actual, lo más común es usar pulverización oral o nasal o la vía con aerosol (por ejemplo, por inhalación) para liberar agentes terapéuticos directamente en los pulmones y el sistema respiratorio. Sin embargo, la invención incluye la liberación de una composición farmacéutica por cualquier vía apropiada teniendo en consideración los avances probables en la ciencia de la liberación de fármacos.

50 En algunas realizaciones, las preparaciones para la liberación inhalada o con aerosol comprenden una pluralidad de partículas. En algunas realizaciones, estas preparaciones tienen un tamaño medio de partículas de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 micrómetros. En algunas realizaciones, las preparaciones para la liberación inhalada o por aerosol se formulan como un polvo seco. En algunas realizaciones, las preparaciones para la liberación inhalada o por aerosol se formulan como un polvo húmedo, por ejemplo, mediante la inclusión de un agente humectante. En algunas realizaciones, el agente humectante se selecciona del grupo que consiste en agua, solución salina u otro líquido de pH fisiológico.

55 En algunas realizaciones, las composiciones se administran como gotas en la cavidad nasal o bucal. En algunas realizaciones, una dosis puede comprender una pluralidad de gotas (por ejemplo, 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1-5, etc.).

60 En algunas realizaciones, las composiciones se administran usando un dispositivo que libera una dosificación medida de una composición farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en cualquier dosis apropiada para conseguir el resultado deseado. En algunas realizaciones, el resultado deseado es una reducción en la intensidad, gravedad y/o frecuencia, y/o el retraso del inicio de uno o más síntomas de la infección gripal.

65 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para administrar una dosis de un polipéptido HA (por ejemplo, variante, fragmento y/o parte característica del mismo) eficaz para competir con HA de gripe por la

unión a glicanos de topología de tipo sombrilla. En algunas realizaciones, dicha unión por HA de gripe se reduce después de la administración de una o más dosis de una composición en comparación con su nivel estando ausente dicha administración. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para administrar una dosis de polipéptido HA eficaz para saturar al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o más del 99 % de los sitios de unión de HA (por ejemplo, sitios de unión de HA que contienen glicanos de topología de tipo sombrilla) presentes en el sujeto (por ejemplo, en el tracto respiratorio del sujeto) que recibe la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para administrar una dosis de un agente de interferencia (por ejemplo, mimético de glicano de topología de tipo sombrilla) eficaz para competir con los receptores de HA por la unión a polipéptidos HA (por ejemplo, en la superficie de partículas de virus de la gripe). En algunas realizaciones, la unión de polipéptidos HA de gripe con receptores de HA se reduce después de la administración de una o más dosis de una composición en comparación con su nivel estando ausente dicha administración. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para administrar una dosis de un agente de interferencia eficaz para saturar al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de los sitios de unión de HA (por ejemplo, sitios de unión de HA que contienen glicanos de topología de tipo sombrilla) presentes en el sujeto (por ejemplo, en el tracto respiratorio del sujeto) que recibe la composición.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a niveles de dosificación suficientes para liberar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de un agente terapéutico por peso corporal del sujeto por día para obtener un efecto terapéutico deseado. Una dosificación deseada puede liberarse a un sujeto solo una vez. Una dosificación deseada puede liberarse más de tres veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, un día sí y otro no, un día sí y dos no, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada dos meses, cada seis meses, cada doce meses, cada dos años, cada tres años, cada cuatro años, cada cinco años, cada 10 años o cada 20 años. En ciertas realizaciones, la dosificación deseada puede liberarse usando múltiples administraciones (por ejemplos, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, o más administraciones).

Se apreciará que las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden emplearse en terapias de combinación. La combinación particular de terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea conseguir. Se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo fin (por ejemplo, un agente útil para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección gripal puede administrarse simultáneamente con otro agente útil para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección gripal) o pueden conseguir efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). La invención incluye la liberación de composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir y/o modificar su metabolismo, inhibir su excreción y/o modificar su distribución dentro del cuerpo.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos. Con la expresión "en combinación con" no se pretende dar a entender que los agentes tienen que administrarse al mismo tiempo y/o formularse para liberarse conjuntamente, aunque estos métodos de liberación están dentro del alcance de la invención. Las composiciones pueden administrarse simultáneamente con, antes o después de uno o más agentes terapéuticos o procedimientos médicos deseados distintos. Se apreciará que los agentes terapéuticamente activos utilizados en combinación pueden administrarse conjuntamente en una sola composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un programa de tiempos determinado para ese agente.

En general, es de esperar que los agentes utilizados en la combinación se utilicen a niveles que no excedan los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en la combinación serán menores que los utilizados individualmente.

En algunas realizaciones, se administran composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más de un agente antiviral (por ejemplo, Oseltamivir [tamiflu], Zanamavir [Releza], etc.) y/o a sialidasa.

Ejemplos

Ejemplo 1: Especificidad de unión al glicano de 2009 A/H1N1 HA

5 Los presentes inventores han caracterizado la especificidad de unión al glicano de 2009 A/H1N1 HA, que infecta principalmente a cerdos, e identificaron formas mutantes de HA de H1 que conducirían a su adaptación humana para una transmisión aérea eficaz de un humano a otro que es característica de los HA del virus H1N1 de la gripe A tanto pandémico como estacional. Aunque se han aislado y secuenciado varias cepas 2009 A/H1N1, hay pocas variaciones intragénicas entre estas. De esta manera, los presentes inventores utilizaron HA de un virus 2009
10 A/H1N1 representativo, es decir, A/California/0409 (denominado en lo sucesivo CA/04).

Materiales y Métodos

Unión de hemaglutinina de CA/04 a tejidos respiratorios humanos

15 Se adquirieron secciones de tejido traqueal humano normal fijado con formalina e incluido en parafina y secciones de tejido alveolar humano de US Biological y US Biomax respectivamente. Las secciones de tejidos se desparafinizaron, se rehidrataron y se prebloquearon con BSA al 1 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Se generaron precomplejos de HA-anticuerpo incubando 20 µg/ml de proteína HA de CA/04
20 recombinante con anticuerpos primarios (ratón anti marcador 6x His, Abcam) y secundarios (IgG de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 Molecular Probes) en una relación de 4:2:1, respectivamente, durante 20 minutos en hielo. Se realizaron estudios de unión a tejidos incubando secciones de tejidos con los complejos HA-anticuerpo diluidos durante 3 horas a TA. Para visualizar los núcleos celulares se tiñeron por contraste las secciones con yoduro de propidio (Invitrogen; 1:100 en TBST) durante 20 minutos a TA. En el caso del pretratamiento con sialidasa, las secciones de tejido se incubaron con 0,2 unidades de Sialidasa A (recombinante de *Arthrobacter ureafaciens*,
25 Prozyme) durante 3 horas a 37 °C antes de la incubación con las proteínas. Las secciones después se lavaron y se visualizaron usando un microscopio con focal de barrido láser Zeiss LSM510.

Unión directa al receptor de HA de CA/04 dependiente de la dosis.

30 La especificidad por el receptor de HA de CA/04 expresada de forma recombinante se investigó usando un panel de glicanos que comprendían glicanos tanto α 2-3 sialilados como α 2-6 sialilados. Los pocillos de placas de 384 pocillos de alta capacidad de unión revestidas con estreptavidina (Pierce) se incubaron con 50 µl de glicanos biotinilados 2,4 µM durante una noche a 4 °C. Los glicanos incluidos fueron 3'-SLN, 3'-SLN-LN, 3'-SLN-LN-LN, 6'-SLN y 6'-SLN-LN (LN corresponde a lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc) y 3'-SLN y 6'-SLN corresponden respectivamente a Neu5Ac α 2-3
35 y Neu5Ac α 2-6 unidos a LN) y se obtuvieron del Consortium of Functional Glycomics (www.functionalglycomics.org) a través de su programa de petición de recursos. Se preparó una solución madre de complejo de HA incubando cantidades apropiadas de proteína HA, anticuerpo primario (IgG de ratón anti marcador 6x His, Abcam) y anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP, Santacruz Biotechnology) en la relación 4:2:1, respectivamente, en hielo durante 20 minutos. Se diluyeron cantidades apropiadas de solución madre de HA previamente en complejo a 250 µl con BSA al 1 % en PBS. Se añadieron 50 µl de HA previamente en complejo a cada uno de los pocillos revestidos con glicano y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas seguido de tres lavados con PBST (PBS + Tween-20 al 0,1 %) y tres lavados con PBS. La señal de unión se determinó basándose en la actividad de HRP usando ensayo de peroxidasa Amplex Red (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del
45 fabricante. Se incluyeron controles negativos apropiados.

Resultados

Propiedades de unión al glicano de HA de 2009 A/H1N1

50 La unión dependiente de la dosis de HA a receptores humanos y aviares representativos en una plataforma de matriz de glicano basada en biotina-estreptavidina permitió la cuantificación usando una constante de unión aparente K_d' (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; incorporado en el presente documento por referencia). El parámetro K_d' puede calcularse ajustando los datos de unión (en un intervalo de concentraciones de HA) usando la ecuación de Hill para la unión multivalente (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; incorporado en el presente documento por referencia). La unidad HA trimérica comprende tres monómeros de HA (con un RBS por monómero). La disposición espacial de los glicanos biotinilados en los pocillos de la matriz de placa de estreptavidina favorece la unión a solo uno de los tres monómeros de HA en la unidad de HA trimérica. Por lo tanto, para aumentar específicamente la multivalencia en las interacciones de HA-glicano, el HA recombinante forma complejo previo con los anticuerpos primarios y secundarios en la relación de
60 4:2:1 (HA:primario:secundario) como se ha descrito previamente (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; y Stevens *et al.*, 2006, Nat. Rev. Microbiol., 4:857-64; ambos incorporados en el presente documento por referencia). La disposición espacial idéntica de 4 unidades de HA triméricas en el precomplejo con respecto a los glicanos en la plataforma de matriz, homogeneiza los efectos de avidéz a través de diferentes HA y por lo tanto permite la comparación cuantitativa entre las fuerzas de unión al glicano de diferentes HA.
65

Las propiedades de unión al glicano del HA de 2009 A/H1N1 se examinaron usando ensayos de unión al receptor directa dependiente de la dosis (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, 105:2800-5; incorporado en el presente documento por referencia) y unión a tejido pulmonar humano (Chandrasekaran *et al.*, 2008, Nat Biotechnol, 26:107-13; incorporado en el presente documento por referencia). Estos ensayos se realizaron con HA de CA/04 que se expresaba de forma recombinante usando una construcción que se diseñó para producir una proteína soluble como se ha descrito previamente (Chandrasekaran *et al.*, 2008, Nat Biotechnol, 26:107-13; incorporado en el presente documento por referencia). En un ensayo de unión al receptor de glicano directa, HA de CA/04 presentó una unión dependiente de la dosis únicamente a un solo glicano α 2-6 (6'SLN-LN) y una unión solo mínima a glicanos α 2-3 (Figura 9A). Aunque el patrón de unión de HA de CA/04 es similar al de HA procedente del virus de la gripe A pandémica de 1918 (A/South Carolina/1/1918; o SC18), la afinidad de unión de HA de CA/04 es menor que la de HA de SC18 (Figura 9B).

El examen de la unión al tejido de HA de CA/04 indica que se une uniformemente a la superficie apical de las secciones de tejido traqueal humano (representativo del tracto respiratorio superior) (Figura 10). Este patrón de unión se correlaciona con la distribución predominante de los glicanos α 2-6 sialilados en la superficie apical del tejido traqueal (Chandrasekaran *et al.*, 2008, Nat Biotechnol, 26:107-13; incorporado en el presente documento por referencia) y la unión a α 2-6 de HA de CA/04 en el ensayo de unión directa. Aunque CA/04 muestra alguna unión a los alveolos, no es tan extensiva como la unión traqueal, lo cual es coherente con la unión mínima de α 2-3 observada en el ensayo de unión directa.

Basándose en los datos anteriores, está claro que, aunque HA de A/2009 H1N1 tiene una selectividad de unión similar a HA de SC18 pandémico, su afinidad de unión a α 2-6 es sustancialmente menos que la de HA de SC18. Previamente se demostró (Tumpey *et al.*, 2007, Science, 315:655-59; incorporado en el presente documento por referencia) que la eficacia de la transmisión aérea (por ejemplo, usando un modelo animal de hurón, que es un modelo animal establecido para la transmisión del virus de la gripe A en seres humanos) se correlaciona con la afinidad de unión de α 2-6 del HA viral. De hecho, una mutación de un solo aminoácido en HA del virus SC18 de transmisión eficiente condujo a un virus (NY18), que se transmitía ineficientemente. La afinidad de unión a α 2-6 de HA de NY18 fue sustancialmente menos que la de HA de SC18 (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, 105:2800-5; incorporado en el presente documento por referencia). De una forma similar, la afinidad de unión a α 2-6 sustancialmente menor de HA de CA/04 con respecto a la de HA de SC18 indica que este virus aún no se ha adaptado completamente al hospedador humano para una transmisión eficaz aérea de un humano a otro. De forma coherente con esta conclusión, la menor fuerza de unión al receptor humano de HA de CA/04 se correlacionaba con la menor eficacia observada de la transmisión del virus CA/04 en hurones en comparación con el SC18 de alta transmisión (véase, por ejemplo, Tumpey *et al.*, 2007, Science, 315:655-59; y Maines *et al.*, 2009, Science, 325:484-87; ambos incorporados en el presente documento por referencia). También se obtuvieron resultados similares en ratones (Maines *et al.*, 2009, Science, 325:484-87; incorporado en el presente documento por referencia).

Análisis estructural de HA de 2009 A/H1N1

Se compararon el sitio de unión al receptor (RBS) de los HA de 2009 A (H1N1) (Soundararajan *et al.*, 2009, Nat Biotechnol, 27: 510-3; incorporado en el presente documento por referencia), usado en este estudio y los de SC18 y los virus H1N1 de la gripe estacional recientes (Figura 11). La similitud en el patrón de unión entre HA de CA/04 y HA de SC18 podría producirse a partir de la mayoría de restos de RBS "similares o análogos" entre esos HA incluyendo Asp190 y Asp225, que son aminoácidos "característicos" de HA de H1N1 adaptados humanos que hacen contactos óptimos con los glicanos α 2-6. Las diferencias en RBS entre HA de SC18 y CA/04 se producen en las posiciones 145, 186, 189, 219 y 227. HA de CA/04 tiene una única Lys145 que proporciona un contacto de anclaje adicional para el ácido siálico (Soundararajan *et al.*, 2009, Nat Biotechnol, 27: 510-3; incorporado en el presente documento por referencia). Los restos en 186, 187, 189 están situados para formar una red de interacción con Asp190 (Soundararajan *et al.*, 2009, Nat Biotechnol, 27: 510-3; incorporado en el presente documento por referencia). En el caso de HA de SC18, esta red implica átomos de oxígeno de Thr187, Thr189 y Asp190 (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, 105:2800-5; y Gamblin *et al.*, 2004, Science, 303, 1838-42; ambos incorporados en el presente documento por referencia). De una forma similar, en el caso de HA de CA/04, los átomos de oxígeno de Ser186, Thr187 y Asp190 podrían formar esta red. Los restos 219 y 227 a su vez influyen en la orientación del resto 186. La comparación de los restos 219 y 227 (Figura 11) revela que los dos aminoácidos son hidrófobos tales como Ala219 y Ala227 (como se observa en HA de SC18) o son restos cargados tales como Lys219 y Glu227 (como se observa en los HA de la gripe estacional). La presente invención incluye el reconocimiento de que los HA de 2009 A(H1N1) tienen una combinación única de Ile219 y Glu227 que da como resultado una serie de interacciones que ni es completamente hidrófoba ni está cargada completamente. Esta combinación podría desestabilizar la red hidrófoba o iónica de restos en 186, 219 y 227, rompiendo de esta manera los contactos óptimos con glicanos α 2-6 sialilados (Figura 12). El análisis del RBS del HA de 2009 A(H1N1) ofrece una explicación de la menor afinidad de unión a α 2-6 de HA de CA/04 en comparación con HA de SC18 a pesar de tener un patrón de unión similar (Figura 9).

El análisis estructural (Figura 12) ofrece una explicación de la menor afinidad debida a una combinación de aminoácidos en el RBS que es única para los HA de 2009 AH1N1. La presente invención incluye el reconocimiento de que ciertas mutaciones en el RBS podrían fijar el asunto de la colocación del Asp190 para un contacto óptimo

con glicanos α 2-6 y por lo tanto aumentar la afinidad por la unión a α 2-6. De acuerdo con la presente invención, las posibles combinaciones de mutaciones que solucionarían este asunto incluyen:

- Ile219→Lys: Esto crearía la red de interacciones entre las posiciones de restos 219, 222, 225, 227 sustancialmente (si no totalmente) iónicas, lo cual a su vez permitiría la colocación de Ser186 para realizar interacciones con Asp190 que, a su vez, colocarían a Asp190 para hacer contacto con α 2-6. Esta parte de la red de interacciones en el HA mutante es similar a la observada en HA de H1N1 de la gripe estacional recientes.
- Ser186→Pro / Ala189→Thr / Glu227 → Ala: Esto crearía la red de interacciones entre posiciones de restos 186, 219 y 227 hidrófobas y la Thr189 en el HA mutante junto con Thr187 se colocaría para formar interacciones con Asp190 lo cual, a su vez, colocaría Asp190 para realizar contactos con α 2-6. Esta parte de la red de interacciones en el HA mutante es similar a la observada para SC18.

Las dos combinaciones de mutaciones indicadas anteriormente conducen a una HA única que es diferente de cualquiera de las HA de H1N1 de la gripe estacional reciente así como HA de SC18.

Análisis

A principios de 2009, se originó una nueva cepa de un virus de la gripe H1N1 (denominado 2009 H1N1) a partir de un virus H1 porcino mezcla triple norteamericano. El riesgo global para la salud que representaba este virus posteriormente hizo que la OMS clasificara esta cepa como pandémica (WHO, 2009, Weekly Epid. Rec., 84: 249-57; incorporado en el presente documento por referencia). Basándose en un análisis extensivo de secuencia y estructural de las proteínas virales de la gripe 2009 H1N1 clave, los presentes inventores investigaron propiedades del virus incluyendo la unión al receptor de glicano de la hemaglutinina viral (HA), resistencia a fármacos, virulencia y transmisibilidad (véase, por ejemplo, Resultados anteriores Soundararajan *et al.*, 2009, Nat. Biotechnol., 27: 510-13; incorporado en el presente documento por referencia). A diferencia de los resultados presentados anteriormente en el Ejemplo 1, que demostraron que HA de CA/04 se une preferentemente a los glicanos α 2-6 (en lugar de a los glicanos α 2-3), Childs *et al.* (2009, Nat. Biotechnol., 27: 797-99 incorporado en el presente documento por referencia) notificaron posteriormente que el virus 2009 H1N1 se unía tanto a glicanos sialilados unidos a α 2→3- (receptores aviares) y α 2→6- (receptores humanos) en el contexto de una plataforma de matriz de glicano basado en lípidos.

El análisis de virus enteros en plataformas de matriz de glicano, presentado por Childs *et al.*, presenta varios retos en la comprensión de diferencias sutiles en la unión debidas a sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión de receptor de glicano (RBC) de HA. Por ejemplo, un método usado comúnmente para medir el título viral está basado en la capacidad del virus de aglutinar los glóbulos rojos (RBC), una propiedad mediada por la unión de HA viral a receptores de glicanos sialilados en la superficie de los RBC. Sin embargo, el uso de este método para comparar cepas mutantes con propiedades de unión al receptor de glicano alteradas entre sí o con una cepa de tipo silvestre (WT) de referencia se complica por el hecho de que el mismo título de hemaglutinación del WT y la forma mutante de un virus puede no corresponder con el mismo número de partículas virales. Este problema puede evitarse en cierta medida mediante el uso de virus marcados directamente (Kumari *et al.*, 2007, Virol. J., 4: 42; incorporado en el presente documento por referencia) o ajustando el título viral basándose en concentraciones equivalentes de proteína viral (por ejemplo, usando electroforesis en gel), como indican Childs *et al.*

Los estudios que se han publicado después de los datos y conclusiones presentados en el Ejemplo 1 se centran en la caracterización *cualitativa* (típicamente a una alta concentración de virus o de HA). Estos estudios se han diseñado de tal forma que pueden observarse señales de unión para el número máximo de glicanos en la matriz (véase, por ejemplo, Childs *et al.*, 2009, Nat. Biotechnol., 27: 797-99; y Hua *et al.*, 2010, PLoS Currents: Influenza; ambos incorporados en el presente documento por referencia). Estos estudios, aunque ofrecen una vaga idea del número de receptores aviares y humanos que se unen a una HA o virus dado, no son adecuados para cuantificar y comparar la fuerza de unión (o afinidad) de las interacciones HA-glicano. Por el contrario, los presentes inventores obtuvieron una información *cuantitativa* diseñando ensayos que analizan la unión en una serie de concentraciones de HA y midiendo la aproximación a la saturación teniendo en cuenta la avidéz y/o los efectos de cooperatividad.

En resumen, los presentes inventores han caracterizado las propiedades de unión al receptor de glicano-HA de 2009 H1N1. Los inventores demostraron que HA procedente de un virus 2009 H1N1 representativo (A/California/04/09 o "CA04") se unían específicamente a receptores humanos en una plataforma de matriz de glicano y en epitelio respiratorio superior humano y no mostraban una unión observable a receptores aviares (véanse los Resultados anteriores y Maines *et al.*, 2009, Science, 325: 484-87; incorporado en el presente documento por referencia). La fuerza de unión de HA de CA04 al receptor humano, sin embargo, fue sustancialmente menor que la de HA del 1918 H1N1 pandémico prototipo, A/South Carolina/1/1918 ("SC18") (véanse los Resultados anteriores y Maines *et al.*, 2009, Science, 325: 484-87; incorporado en el presente documento por referencia). La menor fuerza de unión al receptor humano de HA de CA04 se correlacionaba con la menor eficacia observada de transmisión del virus CA04 (véanse los Resultados anteriores y Maines *et al.*, 2009, Science, 325: 484-87; incorporado en el presente documento por referencia), en comparación con SC18 altamente transmisible) en hurones (véase Tumpey *et al.*, 2007, Science, 315: 655-59; incorporado en el presente documento por referencia). La ausencia de unión observable

por HA de CA04 a receptores aviáres es coherente con el reciente análisis de micromatriz de glicano de HA de 2009 H1N1 (Hua *et al.*, 2010, PLoS Currents: Influenza; incorporado en el presente documento por referencia) pero está en contraste con las observaciones en el informe por Childs *et al.* usando virus enteros. Sin desear limitarse por ninguna teoría particular, estas diferencias pueden atribuirse a las diferencias en la presentación de HA (por ejemplo, como una proteína recombinante frente a en un virus entero) y receptores de glicano en las diferentes plataformas de matriz (véase Childs *et al.*).

Ejemplo 2: Comparación de aislados de 2009 A/H1N1 con Aislados de la Cepa Pandémica de 1918 y 1930

En 1918 y 1930, aparecieron cepas de virus de la gripe H1 que mostraron una mayor infectividad humana en comparación con sus cepas parentales. Cada una de estas cepas condujo a una pandemia de infecciones de gripe en seres humanos.

Los presentes inventores han comparado la unión y/o características de secuencia de las cepas A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930 con una cepa 2009 A/H1N1 representativa, A/California/0409 (CA/04). La presente invención abarca el reconocimiento de que se obtendrían resultados similares para otras cepas 2009 A/H1N1. La presente invención demuestra que 2009 A/H1N1 comparte similitudes significativas tanto con la cepa A/South Carolina/1/1918 como con A/Swine/Iowa/15/1930, y particularmente con la cepa de 1918 (Figura 4A-C). Este descubrimiento implica, entre otras cosas, que (1) la inmunización contra las cepas A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930, y particularmente contra la cepa de 1918, podría proporcionar alguna protección de reacción cruzada contra 2009 A/H1N1; y/o (2) los individuos previamente expuestos a las cepas A/South Carolina/1/1918 y A/Swine/Iowa/15/1930, y particularmente a la cepa de 1918, (a) podrían ser menos susceptibles a la infección y, por lo tanto, podría demostrar una menor necesidad de vacunación y/o tratamiento que los individuos no expuestos previamente; (b) podrían requerir una dosificación de vacuna y/o composiciones terapéuticas menos concentradas, menos potentes y/o menos frecuentes; y/o (c) podrían sensibilizarse debido a la exposición previa y probablemente para conseguir una vacunación satisfactoria.

Ejemplo 3: Características de Unión de Polipéptidos HA de H1

Los expertos habituales en la materia, después de leer la presente memoria descriptiva, apreciarán que pueden usarse técnicas descritas en el presente documento para analizar o determinar las características de unión de polipéptidos H1 procedentes de cualquier fuente. La Tabla 4 mostrada a continuación proporciona secuencias de diversos polipéptidos HA de H1 procedentes de una diversidad de cepas. Algunas de las secuencias presentadas en la Tabla 4 corresponden a la región HA1 (por ejemplo, que contiene todo o parte del sitio de unión al receptor de glicano). Puede accederse a cualquier número de secuencias de polipéptidos HA de H1 adicionales a partir de bases de datos públicas, incluyendo, pero sin limitación, la base de datos del portal de la gripe GISAID (<http://platform.gisaid.org/dante-cms/live/struktur.jdante?aid=1131>) y/o la base de datos de datos de gripe del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>).

Tabla 4: Secuencias de Polipéptidos HA de H1 Ejemplares

Cepa	Secuencia de HA de H1
A/Aichi/8/09 (HA1 solo)	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNG KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYI VEKPNPENGTCYPGHFAEYEELREQLSSVSSFERFEIFPKE SSWPNHTVTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTGKNGLYP NLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIAAQKTLYHTENA YVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEP GDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCD AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMV TGLRNIPSIQSR (SEQ ID NO: 55)
A/Aichi/9/2009 (HA1 solo)	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNG KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYI VEKPNPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPK ESSWPNHTVTGVSASC SHNGENSFYRNLLWLTGKNGLY PNLKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIADQKALYHTEN AYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLE PGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCD AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMV TGLRNIPSIQSR (SEQ ID NO: 56)

ES 2 566 361 T3

Cepa	Secuencia de HA de H1
A/Aichi/37/09 (HA1 solo)	<p>DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNG KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYI VEKPNPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPK ESSWPNHTVTGVSASC SHNGEN SFYRNLLWLTGKNGLY PNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPN IADQKTLYHTEN AYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWPLLE PGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCD AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMV TGLRNIPSIQSR (SEQ ID NO: 57)</p>
A/Brisbane/59/2007 (HA1 solo)	<p>DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNG KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYI VEKPNPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPK ESSWPNHTVTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTGKNGLY PNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQKALYHTEN AYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLLE PGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCD AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMV TGLRNIPSIQSR (SEQ ID NO: 58)</p>
A/Washington/1/09	<p>MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEK NVTVTHSVNLLNSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWI LGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFADYEEL REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGESS FYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVH HPPNIVXQKTLYRTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPK VRDQEGRINYWTLLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALS RGFSGIINSNAPMDKCD AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPV TIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEG GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGI TNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVD DGFIDIWTYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKS QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTY (SEQ ID NO: 59)</p>
A/Canterbury/106/2004	<p>MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEK NVTVTHSVNLLNSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWI LGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFADYEEL REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKS SFYKNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGV HHPNIGDQKALYHTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAKR KVRDQEGRINYWTLLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALS RGFSGIINSNAPMDECD AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPV TIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEG GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGI TNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVD DGFIDIWTYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKS QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKY SEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVS LGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 60)</p>

ES 2 566 361 T3

Cepa	Secuencia de HA de H1
A/New_York/212/2001	<p>MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEK NVTVTHSVNLLLED SHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWI LGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEEL REQLSSVSSFERFEIFPKGSSWPNHTVTGVSASCSHNGKS SFYRNLLWLTGKNGLYPNLSMSYVNNKEKEVLVLWGV HHPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP KVRDQEGRINYWTLLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFAL SRGFGSGIITSNAPMDECDACQTPQGAINSSLPFQNVHP VTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIA GFIE GGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAING ITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNKLERRMENLNKKVD DGFLDIWTYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVK SQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLV SLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 61)</p>
A/New_York/307/2001	<p>KAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKN VTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGTAPLQLGNCSIAGWIL GNPECESLFSKESWSYIAETPNPKNGTCYPGYFADYEEL REQLSSVSSFERFEIFPKDSSWPNHTVTKGVTASCSHNGK SSFYKNLLWLTEKNGLYPNLSKSYVNKKGKEVLVLWG VHHPNMGDQRAIYHKENAYVSVLSSHYSRRFTPEIAKR PKVRDQEGRINYWTLLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFAL LSRGFGSGIISNASMGECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVH PVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNVPSIQSRGLFGAIA GF IEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAING GITNKVNSIIEKMNTQFTA VGKEFNRLERRMENLNKKVD DGFLDIWTYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKDLYEKVK TQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPK YSKESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLV SLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 62)</p>
A/Taiwan/117/1996	<p>MKAKLLVLLCAFTATYADTICIGHHANNSTDTVDTVLE KNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGTAPLQLGNCSVAG WILGNPECESLFSKESWSYIAETPNPENGTCYPGYFADYE ELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTKGVTASCSHN GKSSFYKNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNHKEKEVLVL WGVHHPNIRDQRAIYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIA KRPKVRDQEGRINYWTLLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYA FALS RGFGSGIITSNASMGECDAKCQTPQGAINSSLPFQ VHPVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIA GFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA INGI (SEQ ID NO: 63)</p>

Cepa	Secuencia de HA de H1
A/Brazil/099/01	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDSHNG KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYI VETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKE SSWPNHTVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYP NLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENA YVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEP GDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECD KCQTPQGAINSSLPFQNVHPITIGECPKYVRSALRMVTG LRNIPSIQS (SEQ ID NO: 64)

Las características de unión de estas cepas pueden evaluarse, por ejemplo, con respecto a glicanos con topología de tipo sombrilla y/o con respecto a glicanos con topología de tipo cono. Las características de unión pueden evaluarse con respecto a, por ejemplo, glicanos α 2-6 sialilados y/o con respecto a glicanos α 2-3 sialilados. En algunas realizaciones, las características de unión se evalúan con respecto a al menos glicanos α 2-6 sialilados largos (por ejemplo, glicanos 6'SLN-LN).

Los expertos habituales en la materia, después de leer la presente memoria descriptiva, apreciarán que cualquier polipéptido H1 indicado en la Tabla 4 que muestra características de unión a glicano apropiadas y/o infectividad humana apropiada (por ejemplo, sin infectividad pandémica humana) puede usarse como referencia con la cual se comparan polipéptidos HA de H1 de unión humana "aumentada". De forma comparable, cualquier polipéptido H1 indicado en la Tabla 4 que muestra características de unión al glicano apropiadas (por ejemplo, una unión extensiva a glicanos con topología de tipo sombrilla y/o preferencia por glicanos con topología de tipo sombrilla en comparación con glicanos con topología de tipo cono) y/o infectividad humana apropiada (por ejemplo infectividad pandémica humana) pueden usarse como comparador para confirmar una unión humana "aumentada" de un polipéptido HA de H1 particular (por ejemplo, una variante de polipéptido HA de H1 particular).

Ejemplo 4: Propiedades de Unión al Receptor de HA del Virus de la Gripe A 2009 H1N1 Mutado

Materiales y Métodos

Clonación, síntesis de baculovirus, expresión y purificación de HA

En resumen, se usaron baculovirus recombinantes con genes de HA WT o mutantes, respectivamente, para infectar (MOI=1) cultivos en suspensión de células Sf9 (Invitrogen, Carlsbad, CA) cultivadas en BD Baculogold Max-XP SFM (BD Biosciences, San José, CA). La infección se supervisó y el medio acondicionado se recogió 3-4 días después de la infección. Se purificó HA soluble del medio acondicionado recogido usando cromatografía de afinidad de Níquel (columnas HP HisTrap, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se reunieron las fracciones de elución que contenían HA, se concentraron y se cambió el tampón a 1XPBS pH 8,0 (Gibco) usando columnas de centrifugación 100K PCPM (Millipore, Billerica, MA). La proteína purificada se cuantificó usando el método de BCA (Pierce).

Creación de modelos estructurales basados en la homología de CA/04 y mutantes

Usando la plataforma de creación de modelos de homología automática basada en la web SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), se construyeron modelos estructurales de homología de CA04, CA04M1 y CA04M2. La estructura de molde elegida por SWISS-MODEL fue la de una estructura cristalina resuelta recientemente de HA de 2009 H1N1 (PDB ID: 3LZG). La situación de partida del complejo del receptor humano-HA se obtuvo superponiendo la estructura de HA modelada con la estructura co-cristalina de HA de 1918 H1N1 con el receptor humano (PDB ID: 2WRG). El complejo estructural de partida se sometió a minimización de energía (500 etapas de descenso pronunciado seguidas de 500 etapas de gradiente de conjugado). Se usó el campo de fuerzas AMBER para asignar potenciales y cargas. La versión por defecto de AMBER fue la proporcionada con el módulo Discover del juego de modelado molecular InsightII (Accelrys, San Diego, CA).

Unión de HA de CA04 WT recombinante y mutante a secciones de tejido traqueal humano.

Se desparafinaron secciones de tejido traqueal humano parafinizadas (US Biological), se rehidrataron y se incubaron con BSA al 1 % en PBS durante 30 minutos para prevenir la unión no específica. La HA formó complejo previamente con anticuerpo primario (de ratón anti marcador 6x His, Abcam) y anticuerpo secundario (de cabra anti ratón Alexa fluor 488, Invitrogen) en una relación molar de 4:2:1, respectivamente, durante 20 minutos en hielo. La unión del tejido se realizó con diferentes concentraciones de HA diluyendo el HA previamente en complejo en BSA al 1 %-PBS. Después las secciones de tejido se incubaron con los complejos de HA-anticuerpo durante 3 horas a temperatura ambiente (TA). Las secciones de tejido se tiñeron de forma inversa con yoduro de propidio (Invitrogen;

1:100 en TBST). Las secciones de tejido se montaron y después se visualizaron con un microscopio confocal (microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM510). En el caso del pretratamiento con sialidasa, las secciones de tejido se incubaron con 0,2 unidades de Sialidasa A (recombinante de *Arthrobacter ureafaciens*, Prozyme) durante 3 horas a 37 °C antes de la incubación con las proteínas. Se ha demostrado que esta enzima escinde el Neu5Ac terminal de los motivos Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal y Neu5Ac α 2 \rightarrow 6Gal.

Unión directa dependiente de la dosis de HA de CA04 WT y mutante

Para investigar las interacciones multivalentes de HA-glicano, se usó una matriz de placa de estreptavidina que comprendía glicanos α 2 \rightarrow 3 y α 2 \rightarrow 6 sialilados biotinilados representativos como se ha descrito previamente (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; incorporado en el presente documento por referencia) (Figura 14). 3'SLN, 3'SLN-LN, 3'SLN-LN-LN son receptores aviares representativos. 6'SLN y 6'SLN-LN son receptores humanos representativos. Los glicanos biotinilados se obtuvieron del Consortium of Functional Glycomics a través de su programa de petición de recursos. Se cargaron placas de 384 pocillos de alta capacidad de unión revestidas con estreptavidina (Pierce) hasta la capacidad completa de cada pocillo incubando el pocillo con 50 μ l de glicanos biotinilados 2,4 μ M durante una noche a 4 °C. Los glicanos en exceso se retiraron mediante un lavado extensivo con PBS. La unidad de HA trimérica comprende tres monómeros de HA (y por lo tanto tres RBS, uno para cada monómero) la disposición espacial de los glicanos biotinilados en los pocillos de la matriz en placa de estreptavidina favorece la unión a uno solo de los tres monómeros de HA en la unidad de HA trimérica. Por lo tanto, para aumentar específicamente la multivalencia en las interacciones de HA-glicano, las proteínas HA recombinantes formaron complejos previamente con los anticuerpos primario y secundario en la relación de 4:2:1 (HA:primario:secundario). La disposición idéntica de 4 unidades de HA triméricas en el precomplejo para todos los HA permite la comparación entre sus afinidades de unión al glicano.

Se preparó una solución madre que contenía cantidades apropiadas de proteína HA marcada con histidina, anticuerpo primario (IgG de ratón anti-marcador 6x His) y anticuerpo secundario (IgG de cabra anti ratón conjugada con HRP (Santacruz Biotechnology)) en la relación 4:2:1, respectivamente, y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se diluyeron cantidades apropiadas de HA de solución madre en complejo previo a 250 μ l con BSA al 1 % en PBS. Se añadieron 50 μ l de HA en complejo previo a cada uno de los pocillos revestidos con glicano y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas seguido de las etapas de lavado anteriores. La señal de unión se determinó basándose en la actividad de HRP usando el ensayo de peroxidasa Amplex Red (Invitrogen, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se observaron señales de unión mínimas en los controles negativos incluyendo la unión de la unidad previamente en complejo a pocillos sin glicanos y la unión de los anticuerpos solos a los pocillos con glicanos. Los parámetros de unión, cooperatividad (n) y constante de unión aparente (K_d'), para la unión HA de H2-glicano se calcularon ajustando el valor medio de la señal (procedente del análisis por triplicado) y la concentración de HA con la forma linealizada de la ecuación de Hill:

$$\log\left(\frac{y}{1-y}\right) = n * \log([HA]) - \log(K_d')$$

en la que y es la saturación fraccional (señal media de unión/señal de unión máxima observada). Los valores de y y teóricos calculados usando la ecuación de Hill:

$$y = \frac{[HA]^n}{[HA]^n + K_d'}$$

(para la serie de parámetros n y K_d') se representaron frente a la concentración variable de HA para obtener las curvas de unión para el receptor humano representativo (6'SLN-LN) en Figura 15D y Figura 16.

Resultados

CA04M1 (Ile219 \rightarrow Lys) y CA04M2 (Ser186 \rightarrow Pro+ Ala189 \rightarrow Thr + Glu227 \rightarrow Ala)

En Ejemplo 1, se comparó la secuencia y la estructura del RBS de CA04 con la de HA de H1N1 adaptado a humanos altamente transmisible. En el Ejemplo 1, los inventores predijeron que un desacoplamiento en la interacción entre restos entre Ile219 (hidrófobo) y Glu227 (iónico) en HA de CA04 potencialmente rompe su contacto óptimo con los receptores humanos, lo cual a su vez es responsable de la reducción de la fuerza de unión (Figura 13A) (véase Maines *et al.*, 2009, Science, 325:484-87; incorporado en el presente documento por referencia). Sin deseo de limitarse por ninguna teoría particular, este desacoplamiento puede explicar la incapacidad de las variantes naturales de mejorar sustancialmente la fuerza de unión al receptor humano a pesar de adquirir mutaciones en Asp225 en el RBS. Como se explica en el Ejemplo 1, los presentes inventores proporcionaron la perspectiva de que la corrección de esta combinación desacoplada mejoraría la fuerza de unión al receptor humano de HA de 2009 H1N1. Como se presenta en el Ejemplo 1, el análisis estructural del RBS de HA de CA04 indicó dos posibles formas de corregir este desacoplamiento. La primera posibilidad implicaba una sola mutación Ile219 \rightarrow Lys (CA04M1) que

haría a la interacción Lys219 - Glu227 iónica (Figura 13B) similar a la observada en el RBS de los virus de la gripe H1N1 estacionales (Maines *et al.*, 2009, Science, 325:484-87; incorporado en el presente documento por referencia). La segunda posibilidad implicaba tres cambios de aminoácidos, Ser186→Pro / Ala189→Thr / Glu227→Ala (CA04M2) (Figura 13C) que harían a las interacciones hidrófobas similares a las observadas en el RBS de HA de SC18 (Figura 13D). Los presentes inventores confirmaron que la predicción descrita en el Ejemplo 1 era precisa al expresar de forma recombinante los mutantes CA04M1 y CA04M2 y cuantificar sus fuerzas de unión al receptor de glicano respectivas mediante su análisis (en su estado en complejo previo) usando el análisis de matriz de glicano dependiente de la dosis.

CA04M1 y CA04M2 mostraron una unión específica a los dos receptores humanos representativos (6'SLN y 6'SLN-LN; Figura 14) en la matriz (solo se observaron señales de unión mínimas con receptores aviarios a las mayores concentraciones de 20-40 µg/ml) (Figura 15A,B). La fuerza de unión de CA04M1 ($K_d' \sim 50$ picomolar (pM)) y CA04M2 ($K_d' \sim 6$ pM) a 6'SLN-LN es significativamente mayor que la de HA de CA04 (y las variantes naturales en la posición 225) y está en el mismo intervalo que la de HA de SC18 (Figura 15C). Las diferencias en las fuerzas de unión al receptor humano de los HA de CA04, CA04M1 y CA04M2 también se reflejaron en su tinción de la superficie apical de la sección de tejido traqueal humano, que expresa predominantemente receptores humanos y es una diana para la transmisión viral eficaz por gotas respiratorias (véase, por ejemplo, Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; y Chandrasekaran *et al.*, 2008, Nat. Biotechnol., 26:107-13; ambos incorporados en el presente documento por referencia). En comparación con HA de CA04, las HA de CA04M1 y CA04M2 muestran una tinción más intensa de la superficie apical de las secciones de tejido traqueal humano (Figura 15D). De esta manera, como se predice en el Ejemplo 1, los HA de CA04M1 y CA04M2 mejoraron la fuerza de unión al receptor de HA humano.

A diferencia de los ensayos de unión *cualitativos* descritos por Childs *et al.*, los presentes inventores realizaron ensayos de unión dependientes de la dosis con HA recombinantes que podían *cuantificar* las diferencias en las fuerzas relativas de unión al receptor de glicano de HA WT y mutantes. Usando dichos ensayos, los presentes inventores han demostrado mutantes de HA de CA04 (CA04M1 y CA04M2) que tienen una fuerza de unión al receptor humano significativamente mayor en comparación con HA WT. Estos resultados validaron la predicción presentada en el Ejemplo 1, es decir, que la corrección de interacciones moleculares desacopladas en el RBS de HA de 2009 H1N1 aumenta sustancialmente su fuerza de unión al receptor humano. La presente invención incluye el reconocimiento de que los ensayos de unión *cualitativos* probablemente habrían perdido la identificación de estos mutantes.

La presente invención incluye el reconocimiento de que los HA de 2009 H1N1 mutantes que presentan mayor fuerza de unión al receptor humano probablemente promoverían una mayor transmisión humana de las cepas 2009 H1N1. De hecho, se ha demostrado que la fuerza de unión al receptor humano se correlaciona con una transmisibilidad entre seres humanos del virus H1N1 pandémico 1918 (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; y Tumpey *et al.*, 2007, Science, 315:655-59; ambos incorporados en el presente documento por referencia). Además, la presente invención incluye el reconocimiento de que dichos HA mutantes pueden ser útiles para producción de vacunas y/o agentes terapéuticos como se describe en el presente documento.

CA04M3 (Asp225→Glu), CA04M4 (Asp225→Asn) y CA04M5 (Asp225→Gly)

Aislados recientes de los virus 2009 H1N1 han adquirido mutaciones en el RBS de HA ocasionando de esta manera una preocupación en relación con la posible evolución de una cepa más virulenta y transmisible (Melidou *et al.*, 20 May, 2010, Virus Res.; incorporado en el presente documento por referencia). Notablemente, Asp225, que está implicado en la unión al receptor humano (Srinivasan *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105:2800-05; incorporado en el presente documento por referencia), ha mutado a Glu, Asn o Gly. La supervisión de dichas mutaciones en el sitio de unión al receptor de glicano (RBS) de la hemaglutinina (HA) puede ser útil para evaluar su impacto sobre la transmisibilidad entre seres humanos de los virus 2009 H1N1. La evaluación *cualitativa* de la especificidad de unión de los 225 mutantes demostró que sus propiedades de unión son similares a las del HA WT (Hua *et al.*, 2010, PLoS Currents: Influenza; incorporado en el presente documento por referencia). Por el contrario, los presentes inventores han realizado análisis *cuantitativos* del efecto de mutaciones Asp225 *generadas en el contexto de HA de CA04* sobre la fuerza de unión al receptor humano usando un análisis de unión a matriz de glicano dependiente de la dosis (Figura 16).

El análisis de los presentes inventores demuestra que la especificidad de unión al receptor humano representativo (6'SLN-LN; Figura 14) es la misma entre mutantes Asp225→Glu (CA04M3) y Asp225→Asn (CA04M4), lo cual es coherente con los resultados obtenidos en el estudio previo (Hua *et al.*, 2010, PLoS Currents: Influenza; incorporado en el presente documento por referencia). Sin embargo, hubo diferencias en sus *fuerzas* de unión al receptor humano donde CA04M4 ($K_d' \sim 0,7$ nanomolar (nM)) > CA04 ($K_d' \sim 1$ nM) >> CA04M3 ($K_d' \sim 7$ nM). El mutante Asp225→Gly (CA04M5) mostró una unión dependiente de la dosis espectacularmente reducida a receptores humanos y también se unió a receptores aviarios. La unión del mutante CA04M5 a receptores aviarios representativos está de acuerdo con los estudios previos (Hua *et al.*, 2010, PLoS Currents: Influenza; incorporado en el presente documento por referencia). Los estudios de transmisión se realizan en hurones y ratones esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 y en Maines *et al.* (2009, Science, 325:484-87; ambos incorporados en el presente

documento por referencia) para confirmar estos resultados. Considerados en conjunto, ninguno de los mutantes con las sustituciones de aminoácidos naturales en la posición 225 muestra una fuerza de unión al receptor humano mejorada sustancialmente con respecto al HA WT.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Massachusetts Institute of Technology Jayaraman, Akila Viswanathan, Karthik Raman, Rahul Shriver, Za-chary Sasisekharan, Ram
- 10 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y/O TRATAR UNA INFECCIÓN GRIPAL
- <130> P53874EP-K/KVC
- 15 <140> EP10794834.1
- <141> 02-07-2010
- <150> US61/222.889
- <151> 02-07-2009
- 20 <160> 64
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
- <211> 323
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Virus de la gripe
- <400> 1

```

Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Glu Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu
1 5 10 15

Arg Glu Gln Leu Ser Ser Ile Ser Ser Phe Glu Lys Phe Glu Ile Phe
20 25 30

Pro Lys Ala Ser Ser Trp Pro Asn His Glu Thr Thr Lys Gly Val Thr
35 40 45

Ala Ala Cys Ser Tyr Ser Gly Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu
50 55 60

Trp Ile Thr Lys Lys Gly Thr Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr
65 70 75 80

Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His
85 90 95

Pro Pro Ser Val Ser Glu Gln Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala
100 105 110

Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn Arg Arg Phe Ala Pro Glu
115 120 125

```

ES 2 566 361 T3

Ile Ala Ala Arg Pro Glu Val Arg Gly Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr
 130 135 140

Tyr Trp Thr Leu Leu Asp Gln Gly Asp Thr Ile Thr Phe Glu Ala Thr
 145 150 155 160

Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Asn Lys Gly Ser
 165 170 175

Asp Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro Val His Asn Cys Asp Thr
 180 185 190

Arg Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Leu Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln
 195 200 205

Asn Val His Pro Ile Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser
 210 215 220

Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Ser Ile Gln
 225 230 235 240

Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
 245 250 255

Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln
 260 265 270

Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asp
 275 280 285

Gly Ile Thr Ser Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln
 290 295 300

Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu
 305 310 315 320

Asn Leu Asn

<210> 2
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 2

Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu
 1 5 10 15

ES 2 566 361 T3

Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Lys Phe Glu Ile Phe
 20 25 30
 Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu Thr Thr Lys Gly Val Thr
 35 40 45
 Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu
 50 55 60
 Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr
 65 70 75 80
 Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His
 85 90 95
 Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala
 100 105 110
 Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu
 115 120 125
 Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr
 130 135 140
 Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Thr Phe Glu Ala Thr
 145 150 155 160
 Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Asn Arg Gly Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro Val His Asp Cys Asn Thr
 180 185 190
 Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln
 195 200 205
 Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser
 210 215 220
 Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln
 225 230 235 240
 Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
 245 250 255
 Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln
 260 265 270

ES 2 566 361 T3

Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asp
 275 280 285

Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln
 290 295 300

Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu
 305 310 315 320

Asn Leu Asn

<210> 3
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 3

Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe
 20 25 30

Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala
 35 40 45

Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp
 50 55 60

Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val
 65 70 75 80

Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro
 85 90 95

Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr
 100 105 110

Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile
 115 120 125

Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr
 130 135 140

Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly
 165 170 175

Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys
 180 185 190

Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn
 195 200 205

Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala
 210 215 220

Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser
 225 230 235 240

Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr
 245 250 255

Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly
 260 265 270

Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly
 275 280 285

Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe
 290 295 300

Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn
 305 310 315 320

Leu Asn

- <210> 4
- <211> 321
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Virus de la gripe
- <400> 4

5

10

Ala Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Lys His Leu Leu Thr Ser Val Thr His Phe Glu Lys Val Lys Ile Leu
 20 25 30

Pro Arg Asp Gln Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly Gly Ser Arg Ala

ES 2 566 361 T3

	35						40						45			
Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Asn	Pro	Ser	Phe	Phe	Arg	Asn	Met	Val	Trp	Leu	
	50					55					60					
Thr	Glu	Lys	Gly	Ser	Asn	Tyr	Pro	Ile	Ala	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asn	Asn	
	65				70					75					80	
Thr	Ser	Gly	Lys	Gln	Met	Leu	Val	Ile	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	
				85					90					95		
Asp	Asp	Thr	Glu	Gln	Arg	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Tyr	Val	
			100					105					110			
Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Arg	Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	
		115					120					125				
Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Met	Glu	Phe	Ser	Trp	
	130					135					140					
Thr	Leu	Leu	Glu	Thr	Trp	Asp	Val	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	Thr	Gly	Asn	
	145				150					155					160	
Leu	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Gly	Phe	Lys	Ile	Ser	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Ile	Met	Lys	Thr	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Asn	Cys	Glu	Thr	Lys	Cys	
			180					185					190			
Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Phe	His	Asn	Ile	
		195					200					205				
His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Asp	Arg	
	210					215					220					
Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Ser	Arg	
	225				230					235					240	
Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	
				245					250					255		
Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Asp	Gln	Gly	Ser	
			260					265					270			
Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Ile	
		275					280					285				
Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	
	290					295					300					

ES 2 566 361 T3

Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Leu Glu Asn Leu
 305 310 315 320

Asn

<210> 5
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 5

Arg Asp Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu Lys Val Lys Ile Leu
 20 25 30

Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly Gly Ser Arg Ala
 35 40 45

Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn Met Val Trp Leu
 50 55 60

Thr Glu Lys Gly Ser Asn Tyr Pro Val Ala Lys Gly Ser Tyr Asn Asn
 65 70 75 80

Thr Ser Gly Glu Gln Met Leu Ile Ile Trp Gly Val His His Pro Asn
 85 90 95

Asp Glu Lys Glu Gln Arg Thr Leu Tyr Gln Asn Val Gly Thr Tyr Val
 100 105 110

Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Lys Arg Ser Thr Pro Asp Ile Ala
 115 120 125

Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Leu Gly Ser Arg Met Glu Phe Ser Trp
 130 135 140

Thr Leu Leu Asp Met Trp Asp Thr Ile Asn Phe Glu Ser Thr Gly Asn
 145 150 155 160

Leu Ile Ala Pro Glu Tyr Gly Phe Lys Ile Ser Lys Arg Gly Ser Ser
 165 170 175

Gly Ile Met Lys Thr Glu Gly Thr Leu Glu Asn Cys Glu Thr Lys Cys

ES 2 566 361 T3

			180						185					190			
Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Phe	His	Asn	Val		
		195					200					205					
His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Glu	Lys		
	210					215					220						
Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Ser	Arg		
225					230					235					240		
Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly		
				245					250					255			
Met	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Asp	Gln	Gly	Ser		
			260					265					270				
Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Phe	Asp	Gly	Ile		
		275					280					285					
Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu		
	290					295					300						
Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Ser	Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Leu	Glu	Asn	Leu		
305					310					315					320		

Asn

<210> 6
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 6

Phe	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Thr	Glu	Gly	Phe		
			20					25					30				
Thr	Trp	Thr	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Ala	Cys	Lys	Arg		
		35					40					45					
Gly	Pro	Ala	Asn	Gly	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Lys	Ser		
	50					55					60						

ES 2 566 361 T3

Glu Ser Ala Tyr Pro Val Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn
 65 70 75 80
 Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asn Gln
 85 90 95
 Glu Gln Thr Asp Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Thr Arg Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro
 115 120 125
 Trp Val Arg Gly Gln Pro Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val
 130 135 140
 Lys Pro Gly Asp Val Leu Val Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala
 145 150 155 160
 Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Met Arg Thr Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg
 165 170 175
 Ser Asp Ala Pro Ile Asp Thr Cys Ile Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn
 180 185 190
 Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Ile Thr
 195 200 205
 Tyr Gly Ala Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala
 210 215 220
 Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Gly Lys Gln Thr Arg Gly Leu Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly
 245 250 255
 Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala
 260 265 270
 Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Arg Lys Leu
 275 280 285
 Asn Arg Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys
 290 295 300
 Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu
 305 310 315

<210> 7
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 361 T3

<220>
 <223> Virus de la grippe

<400> 7

5

Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Thr Glu Gly Phe
 20 25 30

Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Asn Ala Cys Lys Arg
 35 40 45

Gly Pro Gly Ser Gly Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser
 50 55 60

Gly Ser Thr Tyr Pro Val Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn
 65 70 75 80

Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Asn Gln
 85 90 95

Glu Gln Thr Ser Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser
 100 105 110

Thr Arg Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro
 115 120 125

Trp Val Arg Gly Leu Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val
 130 135 140

Lys Pro Gly Asp Val Leu Val Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala
 145 150 155 160

Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Met Arg Thr Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg
 165 170 175

Ser Asp Ala Pro Ile Asp Thr Cys Ile Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn
 180 185 190

Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Ile Thr
 195 200 205

Tyr Gly Ala Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala
 210 215 220

ES 2 566 361 T3

Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Leu Phe Gly
 225 230 235 240

Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly
 245 250 255

Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala
 260 265 270

Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu
 275 280 285

Asn Arg Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys
 290 295 300

Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu
 305 310 315

<210> 8
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 8

Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe
 20 25 30

Asn Trp Ala Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Lys Arg
 35 40 45

Arg Ser Asn Lys Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu
 50 55 60

Lys Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys
 65 70 75 80

Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Ser
 85 90 95

Asp Gln Ile Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser
 100 105 110

Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Tyr Arg Pro
 115 120 125

5

10

ES 2 566 361 T3

Arg Val Arg Asp Ile Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val
130 135 140

Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala
145 150 155 160

Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg
165 170 175

Ser Asp Ala Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn
180 185 190

Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr
195 200 205

Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala
210 215 220

Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly
225 230 235 240

Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly
245 250 255

Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala
260 265 270

Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu
275 280 285

Asn Arg Leu Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys
290 295 300

Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu
305 310 315

<210> 9
<211> 319
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Virus de la gripe

10

<400> 9

Val Asp Thr Cys Tyr Pro Phe Asp Val Pro Asp Tyr Gln Ser Leu Arg
1 5 10 15

Ser Ile Leu Ala Asn Asn Gly Lys Phe Glu Phe Ile Ala Glu Glu Phe
20 25 30

ES 2 566 361 T3

Gln Trp Asn Thr Val Lys Gln Asn Gly Lys Ser Gly Ala Cys Lys Arg
35 40 45

Ala Asn Val Asn Asp Phe Phe Asn Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser
50 55 60

Asn Gly Asp Ala Tyr Pro Leu Gln Asn Leu Thr Lys Val Asn Asn Gly
65 70 75 80

Asp Tyr Ala Arg Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Gln Thr Asp Leu Tyr Lys Asn Asn Pro Gly Arg Val Thr Val
100 105 110

Ser Thr Lys Thr Ser Gln Thr Ser Val Val Pro Asn Ile Gly Ser Arg
115 120 125

Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Thr Ile
130 135 140

Val Asp Pro Gly Asp Ile Ile Val Phe Asn Thr Ile Gly Asn Leu Ile
145 150 155 160

Ala Pro Arg Gly His Tyr Lys Leu Asn Ser Gln Lys Lys Ser Thr Ile
165 170 175

Leu Asn Thr Ala Val Pro Ile Gly Ser Cys Val Ser Lys Cys His Thr
180 185 190

Asp Arg Gly Ser Ile Thr Thr Thr Lys Pro Phe Gln Asn Ile Ser Arg
195 200 205

Ile Ser Ile Gly Asp Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Gly Ser Leu Lys
210 215 220

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

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Gln Gly Leu Ile
245 250 255

Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Glu Gly Thr Gly Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
275 280 285

ES 2 566 361 T3

Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Tyr His Gln Ile
 290 295 300

Glu Lys Glu Phe Glu Gln Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu
 305 310 315

<210> 10
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 10

Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile
 20 25 30

Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser
 35 40 45

Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp
 50 55 60

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

Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro
 85 90 95

Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr
 100 105 110

Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile
 115 120 125

Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe
 130 135 140

Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

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

Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys
 180 185 190

ES 2 566 361 T3

Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn
 195 200 205

Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn
 210 215 220

Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg
 225 230 235 240

Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 245 250 255

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 260 265 270

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 275 280 285

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 290 295 300

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 305 310 315 320

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn
 325

<210> 11
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 11

Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile
 20 25 30

Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser
 35 40 45

Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp
 50 55 60

Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn

ES 2 566 361 T3

<220>
 <223> Virus de la grippe

<400> 12

5

Gln Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn Glu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ile Gly Ser Gly Glu Arg Ile Glu Arg Phe Glu Met Phe
 20 25 30

Pro Lys Ser Thr Trp Ser Gly Val Asn Thr Asn Asn Gly Val Thr Arg
 35 40 45

Ala Cys Pro Asp Asn Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp
 50 55 60

Ile Thr Lys Thr Asn Ser Ala Ala Tyr Pro Val Ile Lys Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

Asn Asn Thr Gly Asn Gln Pro Ile Leu Tyr Phe Trp Gly Val His His
 85 90 95

Pro Pro Asp Thr Asn Ala Gln Asn Asn Leu Tyr Gly Ser Gly Asp Arg
 100 105 110

Tyr Val Arg Met Gly Thr Glu Ser Met Asn Phe Ala Lys Gly Pro Glu
 115 120 125

Ile Ser Ala Arg Pro Val Val Asn Gly Gln Arg Gly Arg Ile Asp Tyr
 130 135 140

Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Glu Ser Asn
 145 150 155 160

Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Tyr Lys Phe Val Ser Thr Asn
 165 170 175

Ser Lys Gly Ala Val Phe Lys Ser Asn Leu Pro Ile Glu Asn Cys Asp
 180 185 190

Ala Thr Cys Gln Thr Ile Ala Gly Val Leu Arg Thr Asn Lys Thr Phe
 195 200 205

Gln Asn Val Ser Pro Leu Trp Ile Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Val Lys

ES 2 566 361 T3

210	215	220
Ser Glu Ser Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Gln Ile		
225	230	235 240
Ala Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly		
	245	250 255
Trp Thr Gly Leu Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Glu Asn Ser		
	260	265 270
Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Arg Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile		
	275	280 285
Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr		
290	295	300
Gln Phe Glu Ala Val Asp His Glu Phe Ser Asn Leu Glu Arg Arg Ile		
305	310	315 320
Asp Asn Met Asn		

5 <210> 13
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 13

Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn Glu Glu Ala Leu Arg
1 5 10 15
Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asn Lys Glu Thr Met Gly Phe
20 25 30
Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr Ser Thr Cys Arg Arg
35 40 45
Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp Leu Leu Ser Asn Thr
50 55 60
Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Arg
65 70 75 80
Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His His Ser Gly Ser Thr
85 90 95

ES 2 566 361 T3

Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Lys Leu Ile Thr Val
 100 105 110

Glu Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro Ser Pro Gly Ala Arg
 115 120 125

Pro Lys Val Asp Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp Phe His Trp Leu Met
 130 135 140

Leu Asn Pro Asn Asp Thr Ile Thr Phe Ser Phe Asn Gly Ala Phe Ile
 145 150 155 160

Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys Ser Met Gly Ile Gln
 165 170 175

Ser Gly Val Gln Val Asp Asp Asn Cys Glu Gly Asp Cys Tyr His Ser
 180 185 190

Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln Asn Ile Asn Ser Arg
 195 200 205

Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Glu Ser Leu Met Leu
 210 215 220

Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro Lys Gly Arg Gly Leu
 225 230 235 240

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Leu Ile
 245 250 255

Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr
 260 265 270

Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly
 275 280 285

Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile
 290 295 300

Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile Gly Asn Val Ile
 305 310 315

<210> 14
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 14

5

10

ES 2 566 361 T3

Pro Glu Gly Met Cys Tyr Pro Gly Ser Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Arg Phe Val Phe Ser Ser Ala Ala Ser Tyr Lys Arg Ile Arg Leu Phe
 20 25 30
 Asp Tyr Ser Arg Trp Asn Val Thr Arg Ser Gly Thr Ser Lys Ala Cys
 35 40 45
 Asn Ala Ser Thr Gly Gly Gln Ser Phe Tyr Arg Ser Ile Asn Trp Leu
 50 55 60
 Thr Lys Lys Lys Pro Asp Thr Tyr Asp Phe Asn Glu Gly Ala Tyr Val
 65 70 75 80
 Asn Asn Glu Asp Gly Asp Ile Ile Phe Leu Trp Gly Ile His His Pro
 85 90 95
 Pro Asp Thr Lys Glu Gln Thr Thr Leu Tyr Lys Asn Ala Asn Thr Leu
 100 105 110
 Ser Ser Val Thr Thr Asn Thr Ile Asn Arg Ser Phe Gln Pro Asn Ile
 115 120 125
 Gly Pro Arg Pro Leu Val Arg Gly Gln Gln Gly Arg Met Asp Tyr Tyr
 130 135 140
 Trp Gly Ile Leu Lys Arg Gly Glu Thr Leu Lys Ile Arg Thr Asn Gly
 145 150 155 160
 Asn Leu Ile Ala Pro Glu Phe Gly Tyr Leu Leu Lys Gly Glu Ser Tyr
 165 170 175
 Gly Arg Ile Ile Gln Asn Glu Asp Ile Pro Ile Gly Asn Cys Asn Thr
 180 185 190
 Lys Cys Gln Thr Tyr Ala Gly Ala Ile Asn Ser Ser Lys Pro Phe Gln
 195 200 205
 Asn Ala Ser Arg His Tyr Met Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Lys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Arg Leu Ala Val Gly Leu Arg Asn Thr Pro Ser Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
 245 250 255

ES 2 566 361 T3

Ser Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe His His Ser Asn Ser Glu
 260 265 270

Gly Thr Gly Met Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asp
 275 280 285

Lys Ile Thr Asn Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Arg Glu
 290 295 300

Phe Glu Val Val Asn His Glu Phe Ser Glu Val Glu Lys Arg Ile Asn
 305 310 315 320

Met Ile Asn

<210> 15
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 15

Val Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asn Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Arg Thr Leu Phe Ser Ser Ala Ser Ser Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe
 20 25 30

Pro Asp Thr Ile Trp Asn Val Thr Tyr Thr Gly Thr Ser Lys Ala Cys
 35 40 45

Ser Gly Ser Phe Tyr Arg Ser Met Arg Trp Leu Thr Gln Lys Ser Gly
 50 55 60

Ser Tyr Pro Val Gln Asp Ala Gln Tyr Thr Asn Asn Arg Glu Lys Ser
 65 70 75 80

Ile Leu Phe Val Trp Gly Ile His His Pro Pro Thr Asp Thr Ala Gln
 85 90 95

Thr Asn Leu Tyr Ile Asn Thr Asp Thr Thr Thr Ser Val Thr Thr Glu
 100 105 110

Asp Leu Asn Arg Ile Phe Lys Pro Val Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val
 115 120 125

Asn Gly Leu Gln Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro
 130 135 140

5

10

ES 2 566 361 T3

Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp
145 150 155 160

Tyr Gly His Val Leu Ser Gly Gly Ser His Gly Arg Ile Leu Lys Thr
165 170 175

Asp Leu Asn Ser Gly Asn Cys Val Val Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly
180 185 190

Gly Leu Asn Ser Thr Leu Pro Phe His Asn Ile Ser Lys Tyr Ala Phe
195 200 205

Gly Ile Cys Pro Lys Tyr Val Arg Val Lys Ser Leu Lys Leu Ala Val
210 215 220

Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Arg Ser Asn Arg Gly Leu Phe Gly Ala
225 230 235 240

Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Pro Gly Leu Val Ala Gly Trp
245 250 255

Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp
260 265 270

Arg Asp Ser Thr Gln Arg Ala Ile Asp Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn
275 280 285

Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Lys Gln Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu
290 295 300

Phe Ser Glu Val Glu Thr Arg Leu Asn His Ile Asn
305 310 315

<210> 16
<211> 321
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 16

Ile Ala Tyr Cys Tyr Pro Gly Ala Thr Val Asn Glu Glu Ala Leu Arg
1 5 10 15

Gln Lys Ile Met Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys Ile Ser Thr Gly Phe
20 25 30

Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Asn Ser Ala Gly Thr Thr Arg Ser Cys Met
35 40 45

5

10

ES 2 566 361 T3

Arg Ser Gly Gly Asn Ser Phe Tyr Ala Glu Leu Lys Trp Leu Val Ser
50 55 60

Lys Asn Lys Gly Gln Asn Phe Pro Gln Thr Ala Asn Thr Tyr Arg Asn
65 70 75 80

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

Ser Thr Gln Glu Lys Asn Asp Leu Tyr Gly Thr Gln Ser Leu Ser Ile
100 105 110

Ser Val Gly Ser Ser Thr Tyr Gln Asn Asn Phe Val Pro Val Val Gly
115 120 125

Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp Phe His Trp
130 135 140

Thr Met Val Gln Pro Gly Asp Asn Ile Thr Phe Ser His Asn Gly Gly
145 150 155 160

Leu Ile Ala Pro Ser Arg Val Ser Lys Leu Lys Gly Arg Gly Leu Gly
165 170 175

Ile Gln Ser Gly Ala Ser Val Asp Asn Asp Cys Glu Ser Lys Cys Phe
180 185 190

Trp Lys Gly Gly Ser Ile Asn Thr Lys Leu Pro Phe Gln Asn Leu Ser
195 200 205

Pro Arg Thr Val Gly Gln Cys Pro Lys Tyr Val Asn Lys Lys Ser Leu
210 215 220

Leu Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Val Val Gln Gly Arg
225 230 235 240

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
245 250 255

Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Gln Gly Thr
260 265 270

Gly Gln Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile
275 280 285

Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Thr Glu Phe Glu
290 295 300

Ser Ile Glu Ser Glu Phe Ser Glu Ile Glu His Gln Ile Gly Asn Val
 305 310 315 320

Ile

<210> 17
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 17

Thr Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Thr Leu Glu Asn Glu Glu Glu Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Lys Phe Ser Gly Val Leu Glu Phe Ser Lys Phe Glu Ala Phe Thr
 20 25 30

Ser Asn Gly Trp Gly Ala Val Asn Ser Gly Ala Gly Val Thr Ala Ala
 35 40 45

Cys Lys Phe Gly Ser Ser Asn Ser Phe Phe Arg Asn Met Ile Trp Leu
 50 55 60

Ile His Gln Ser Gly Thr Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Phe Asn Asn
 65 70 75 80

Thr Lys Gly Arg Asp Val Leu Val Val Trp Gly Val His His Pro Ala
 85 90 95

Thr Leu Lys Glu His Gln Asp Leu Tyr Lys Lys Asp Ser Ser Tyr Val
 100 105 110

Ala Val Asp Ser Glu Ser Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ser
 115 120 125

Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg His Thr Phe Tyr Trp
 130 135 140

Thr Ile Val Lys Pro Gly Glu Ala Ile Thr Phe Glu Ser Asn Gly Ala
 145 150 155 160

Phe Leu Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu Leu Val Ser Leu Gly Asn Gly
 165 170 175

Lys Leu Phe Arg Ser Asp Leu Asn Ile Glu Ser Cys Ser Thr Lys Cys
 180 185 190

ES 2 566 361 T3

Gln Ser Glu Ile Gly Gly Ile Asn Thr Asn Arg Ser Phe His Asn Val
 195 200 205

His Arg Asn Thr Ile Gly Asp Cys Pro Lys Tyr Val Asn Val Lys Ser
 210 215 220

Leu Lys Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Ile Ala Thr Arg
 225 230 235 240

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Pro Gly
 245 250 255

Leu Ile Asn Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Arg Asn Glu Glu Gly Thr
 260 265 270

Gly Ile Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gln Ile
 275 280 285

Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Arg Met Asn Thr Asn Phe Glu
 290 295 300

Ser Val Gln His Glu Phe Ser Glu Ile Glu Glu Arg Ile Asn Gln Leu
 305 310 315 320

Ser

<210> 18
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 18

Met Glu Gly Val Cys Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Asn Gln Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Phe Ser Ser Ile Lys Lys Tyr Glu Arg Val Lys Met Phe
 20 25 30

Asp Phe Thr Lys Trp Asn Val Thr Tyr Thr Gly Thr Ser Arg Ala Cys
 35 40 45

Asn Asn Thr Ser Asn Arg Gly Ser Phe Tyr Arg Ser Met Arg Trp Leu
 50 55 60

Thr Leu Lys Ser Gly Gln Phe Pro Val Gln Thr Asp Glu Tyr Lys Asn

5

10

ES 2 566 361 T3

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 19

5

```

Pro His Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Glu Leu Asn Asn Asn Gly Glu Leu
1          5          10          15

Arg His Leu Phe Ser Gly Ile Arg Ser Phe Ser Arg Thr Glu Leu Ile
          20          25          30

Pro Pro Thr Ser Trp Gly Glu Val Leu Asp Gly Ala Thr Ser Ala Cys
          35          40          45

Arg Asp Asp Lys Gly Thr Asn Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Val Trp Phe
50          55          60

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

Thr Thr Gly Arg Asp Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Val
          85          90          95

Ser Val Glu Glu Thr Lys Thr Leu Tyr Val Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
          100          105          110

Leu Val Ser Thr Lys Ser Trp Ser Glu Lys Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
          115          120          125

Val Arg Pro Gly Tyr Asn Gly Gln Arg Ser Trp Met Lys Ile Tyr Trp
          130          135          140

Ser Leu Leu His Pro Gly Glu Met Ile Thr Phe Glu Ser Asn Gly Gly
145          150          155          160

Leu Leu Ala Pro Arg Tyr Gly Tyr Ile Ile Glu Glu Tyr Gly Lys Gly
          165          170          175

Arg Ile Phe Gln Ser Arg Ile Arg Met Ser Lys Cys Asn Thr Lys Cys
          180          185          190

Gln Thr Ser Val Gly Gly Ile Asn Thr Asn Arg Thr Phe Gln Asn Ile
          195          200          205

Asp Lys Asn Ala Leu Gly Asp Cys Pro Lys Tyr Ile Lys Ser Gly Gln
    
```

ES 2 566 361 T3

210 215 220

Leu Lys Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Ile Asp Asn Arg
 225 230 235 240

Gly Leu Leu Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Pro Gly
 245 250 255

Leu Ile Asn Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Gln Asn Glu Gln Gly Thr
 260 265 270

Gly Ile Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gln Ile
 275 280 285

Thr Thr Lys Ile Asn Asn Ile Ile Asp Lys Met Asn Gly Asn Tyr Asp
 290 295 300

Ser Ile Arg Gly Glu Phe Asn Gln Val Glu Lys Arg Ile Asn Met Leu
 305 310 315 320

Ala

<210> 20
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 20

Val Asp Thr Cys Tyr Pro Phe Asp Val Pro Asp Tyr Gln Ser Leu Arg
 1 5 10 15

Ser Ile Leu Ala Ser Ser Gly Ser Leu Glu Phe Ile Ala Glu Gln Phe
 20 25 30

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

Gly Gly Arg Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Glu
 50 55 60

Thr Asn Gly Asn Tyr Gly Pro Ile Asn Val Thr Lys Glu Asn Thr Gly
 65 70 75 80

Ser Tyr Val Arg Leu Tyr Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Ser Asp
 85 90 95

ES 2 566 361 T3

Asn Glu Gln Thr Asp Leu Tyr Lys Val Ala Thr Gly Arg Val Thr Val
 100 105 110

Ser Thr Arg Ser Asp Gln Ile Ser Ile Val Pro Asn Ile Gly Ser Arg
 115 120 125

Pro Arg Val Arg Asn Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Leu
 130 135 140

Val Asn Pro Gly Asp Ser Ile Ile Phe Asn Ser Ile Gly Asn Leu Ile
 145 150 155 160

Ala Pro Arg Gly His Tyr Lys Ile Ser Lys Ser Thr Lys Ser Thr Val
 165 170 175

Leu Lys Ser Asp Lys Arg Ile Gly Ser Cys Thr Ser Pro Cys Leu Thr
 180 185 190

Asp Lys Gly Ser Ile Gln Ser Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Ser Arg
 195 200 205

Ile Ala Ile Gly Asn Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Gly Ser Leu Met
 210 215 220

Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Ile Pro Gly Lys Gln Ala Lys Gly Leu
 225 230 235 240

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Gln Gly Leu Ile
 245 250 255

Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Glu Gly Thr Gly Thr
 260 265 270

Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
 275 280 285

Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Tyr His Gln Ile
 290 295 300

Glu Lys Glu Phe Glu Gln Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu
 305 310 315

<210> 21
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 21

5

10

ES 2 566 361 T3

Ser Asp Ile Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Thr Asn Glu Glu Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Gln Ile Ile Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys Glu Pro Met Gly Phe
 20 25 30

Arg Tyr Ser Gly Ile Lys Thr Asp Gly Ala Thr Ser Ala Cys Lys Arg
 35 40 45

Thr Val Ser Ser Phe Tyr Ser Glu Met Lys Trp Leu Leu Ser Ser Lys
 50 55 60

Ala Asn Gln Val Phe Pro Gln Leu Asn Gln Thr Tyr Arg Asn Asn Arg
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Ala Leu Ile Val Trp Gly Val His His Ser Ser Ser Leu
 85 90 95

Asp Glu Gln Asn Lys Leu Tyr Gly Ala Gly Asn Lys Leu Ile Thr Val
 100 105 110

Gly Ser Ser Lys Tyr Gln Gln Ser Phe Ser Pro Ser Pro Gly Asp Arg
 115 120 125

Pro Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg Ile Asp Phe His Trp Met Leu
 130 135 140

Leu Asp Pro Gly Asp Thr Val Thr Phe Thr Phe Asn Gly Ala Phe Ile
 145 150 155 160

Ala Pro Asp Arg Ala Thr Phe Leu Arg Ser Asn Ala Pro Ser Gly Val
 165 170 175

Glu Tyr Asn Gly Lys Ser Leu Gly Ile Gln Ser Asp Ala Gln Ile Asp
 180 185 190

Glu Ser Cys Glu Gly Glu Cys Phe Tyr Ser Gly Gly Thr Ile Asn Ser
 195 200 205

Pro Leu Pro Phe Gln Asn Ile Asp Ser Trp Ala Val Gly Arg Cys Pro
 210 215 220

Arg Tyr Val Lys Gln Ser Ser Leu Pro Leu Ala Leu Gly Met Lys Asn
 225 230 235 240

Val Pro Glu Lys Ile His Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 245 250 255

ES 2 566 361 T3

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 260 265 270

Arg His Gln Asn Ala Gln Gly Gln Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser
 275 280 285

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile
 290 295 300

Glu Lys Thr Asn Thr Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu
 305 310 315 320

Val Glu Gln Gln Ile Gly Asn Val Ile
 325

<210> 22
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 22

Pro Asn Lys Leu Cys Phe Pro Gly Glu Leu Asp Asn Asn Gly Glu Leu
 1 5 10 15

Arg His Leu Phe Ser Gly Val Asn Ser Phe Ser Arg Thr Glu Leu Ile
 20 25 30

Ser Pro Asn Lys Trp Gly Asp Ile Leu Asp Gly Val Thr Ala Ser Cys
 35 40 45

Arg Asp Asn Gly Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Val Trp Ile Val
 50 55 60

Lys Asn Lys Asn Gly Lys Tyr Pro Val Ile Lys Gly Asp Tyr Asn Asn
 65 70 75 80

Thr Thr Gly Arg Asp Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asp
 85 90 95

Thr Glu Thr Thr Ala Ile Asn Leu Tyr Ala Ser Lys Asn Pro Tyr Thr
 100 105 110

Leu Val Ser Thr Lys Glu Trp Ser Lys Arg Tyr Glu Leu Glu Ile Gly
 115 120 125

Thr Arg Ile Gly Asp Gly Gln Arg Ser Trp Met Lys Leu Tyr Trp His
 130 135 140

5

10

ES 2 566 361 T3

Leu Met Arg Pro Gly Glu Arg Ile Met Phe Glu Ser Asn Gly Gly Leu
 145 150 155 160

Ile Ala Pro Arg Tyr Gly Tyr Ile Ile Glu Lys Tyr Gly Thr Gly Arg
 165 170 175

Ile Phe Gln Ser Gly Val Arg Met Ala Lys Cys Asn Thr Lys Cys Gln
 180 185 190

Thr Ser Leu Gly Gly Ile Asn Thr Asn Lys Thr Phe Gln Asn Ile Glu
 195 200 205

Arg Asn Ala Leu Gly Asp Cys Pro Lys Tyr Ile Lys Ser Gly Gln Leu
 210 215 220

Lys Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Ser Val Gly Glu Arg Gly
 225 230 235 240

Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Pro Gly Leu
 245 250 255

Ile Asn Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Gln Asn Glu Gln Gly Thr Gly
 260 265 270

Ile Ala Ala Asp Lys Ala Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Glu Ile Thr
 275 280 285

Thr Lys Ile Asn Asn Ile Ile Glu Lys Met Asn Gly Asn Tyr Asp Ser
 290 295 300

Ile Arg Gly Glu Phe Asn Gln Val Glu Lys Arg Ile Asn Met Leu Ala
 305 310 315 320

<210> 23
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 23

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Ile Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Ile
 20 25 30

Ser Ser Phe Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Ala Ser Ser Trp Pro
 35 40 45

Asn His Glu Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ser Gly
 50 55 60

Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Ile Thr Lys Lys Gly Thr
 65 70 75 80

Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu
 85 90 95

Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Ser Val Ser Glu Gln
 100 105 110

Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser
 115 120 125

Lys Tyr Asn Arg Arg Phe Ala Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Glu Val
 130 135 140

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

Gly Asp Thr Ile

- <210> 24
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Virus de la gripe

10

- <400> 24

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Val Glu Thr Ser Asn Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val
 20 25 30
 Ser Ser Phe Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro
 35 40 45
 Asn His Glu Thr Thr Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro Tyr Ala Gly
 50 55 60
 Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn
 65 70 75 80
 Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu
 85 90 95
 Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Ser Thr Asp Gln
 100 105 110
 Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser
 115 120 125
 Lys Tyr Asp Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val
 130 135 140
 Arg Gly Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro
 145 150 155 160
 Gly Asp Thr Ile

- <210> 25
- <211> 163
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Virus de la gripe
- <400> 25

5

10

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro
 1 5 10 15

Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val
 20 25 30

Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro
 35 40 45

Asn His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys
 50 55 60

Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser
 65 70 75 80

Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val
 85 90 95

Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Pro Asn Ser Lys Glu Gln Gln
 100 105 110

Asn Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn
 115 120 125

Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg
 130 135 140

Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly
 145 150 155 160

Asp Thr Ile

- <210> 26
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Virus de la gripe
- <400> 26

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Val Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro
 1 5 10 15

Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val
 20 25 30

Ser Ser Phe Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro
 35 40 45

Asn His Glu Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly
 50 55 60

Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser
 65 70 75 80

Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu
 85 90 95

Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln
 100 105 110

Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser
 115 120 125

Lys Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val
 130 135 140

Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro
 145 150 155 160

Gly Asp Thr Ile

- <210> 27
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Virus de la gripe

- <400> 27

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Ala Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro
 1 5 10 15
 Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val
 20 25 30
 Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro
 35 40 45
 Asn His Thr Val Thr Lys Gly Val Thr Thr Ser Cys Ser His Asn Gly
 50 55 60
 Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Asn Gly
 65 70 75 80
 Leu Tyr Pro Asn Val Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu
 85 90 95
 Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln
 100 105 110
 Arg Ala Ile Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser
 115 120 125
 His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val
 130 135 140
 Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro
 145 150 155 160
 Gly Asp Thr Ile

<210> 28
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 28

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Val Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro
 1 5 10 15

Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val
 20 25 30

Ser Ser Phe Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro
 35 40 45

Asn His Glu Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly
 50 55 60

Ala Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser
 65 70 75 80

Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu
 85 90 95

Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln
 100 105 110

Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser
 115 120 125

Lys Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val
 130 135 140

Arg Gly Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro
 145 150 155 160

Gly Asp Thr Ile

- <210> 29
- <211> 159
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Virus de la gripe
- <400> 29

ES 2 566 361 T3

Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr
 1 5 10 15
 Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly
 20 25 30
 Thr Leu Glu Phe Ile Thr Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln
 35 40 45
 Asn Gly Gly Ser Ser Ala Cys Lys Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Phe
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Glu Ser Ala Tyr Pro Val Leu
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp
 85 90 95
 Gly Val His His Pro Ser Thr Asn Gln Glu Gln Thr Asn Leu Tyr Val
 100 105 110
 Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Arg Arg Ser Gln Gln Thr
 115 120 125
 Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Pro Gly
 130 135 140
 Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Val Leu
 145 150 155

5 <210> 30
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 30

ES 2 566 361 T3

Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr
 1 5 10 15
 Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly
 20 25 30
 Thr Leu Glu Phe Ile Thr Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln
 35 40 45
 Asn Gly Gly Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Gly Ser Gly Phe Phe
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Thr Tyr Pro Val Leu
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp
 85 90 95
 Gly Ile His His Pro Ser Thr Asn Gln Glu Gln Thr Ser Leu Tyr Val
 100 105 110
 Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Arg Arg Ser Gln Gln Thr
 115 120 125
 Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Leu Ser Ser
 130 135 140
 Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Val Leu
 145 150 155

<210> 31
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 31

ES 2 566 361 T3

Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr
 1 5 10 15
 Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly
 20 25 30
 Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln
 35 40 45
 Asn Gly Thr Ser Ser Ser Cys Lys Arg Arg Ser Ile Lys Ser Phe Phe
 50 55 60
 Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Gln Leu Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp
 85 90 95
 Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Thr
 100 105 110
 Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr
 115 120 125
 Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Ile Ser Ser
 130 135 140
 Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu
 145 150 155

5 <210> 32
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 32

ES 2 566 361 T3

Ser Tyr Ile Val Glu Lys Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr Pro
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Thr
 20 25 30

Asn His Phe Glu Lys Ile Arg Ile Ile Pro Arg Ser Ser Trp Ser Asn
 35 40 45

His Asp Ala Ser Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg
 50 55 60

Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala
 65 70 75 80

Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu
 85 90 95

Leu Ile Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr
 100 105 110

Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr
 115 120 125

Leu Asn Gln Arg Ser Val Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn
 130 135 140

Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn
 145 150 155 160

Asp Ala Ile

- <210> 33
- <211> 163
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Virus de la gripe
- 10 <400> 33

Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro
 1 5 10 15

ES 2 566 361 T3

Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile
 20 25 30

Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser
 35 40 45

His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys
 50 55 60

Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu
 85 90 95

Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr
 100 105 110

Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr
 115 120 125

Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn
 130 135 140

Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn
 145 150 155 160

Asp Ala Ile

- <210> 34
- <211> 566
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Virus de la gripe

- <400> 34

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val

ES 2 566 361 T3

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

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

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

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

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

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 35
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 361 T3

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 35

5

```

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1           5           10           15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
          20           25           30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
          35           40           45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
          50           55           60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65           70           75           80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
          85           90           95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
          100          105          110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
          115          120          125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
          130          135          140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145          150          155          160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
          165          170          175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
          180          185          190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
          195          200          205

Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
210          215          220
    
```

ES 2 566 361 T3

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

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

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

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

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

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

ES 2 566 361 T3

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

- <210> 36
- <211> 566
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Virus de la gripe

- <400> 36

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

ES 2 566 361 T3

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Pro Thr Ser Thr Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
 210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

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

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

ES 2 566 361 T3

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

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

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 37
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 37

Met Glu Ala Arg Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

5

10

ES 2 566 361 T3

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu
130 135 140

Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn
210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Leu Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro
275 280 285

ES 2 566 361 T3

Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn
 290 295 300
 Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320
 Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335
 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380
 Thr Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
 405 410 415
 Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Ala Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540

ES 2 566 361 T3

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 38
<211> 565
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 38

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Arg Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Thr Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

ES 2 566 361 T3

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205

His Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220

Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
 225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285

Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365

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

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Ile
 420 425 430

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

ES 2 566 361 T3

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

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

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 39
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 39

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

5

10

ES 2 566 361 T3

Val Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Lys Ala Leu Tyr
195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met
275 280 285

Asp Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
340 345 350

ES 2 566 361 T3

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365

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

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Ile
 420 425 430

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

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

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

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 40
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 40

5

10

ES 2 566 361 T3

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
 20 25 30
 Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala
 35 40 45
 Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
 50 55 60
 Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80
 Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe Ala
 85 90 95
 Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
 100 105 110
 Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val
 115 120 125
 Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Asn Ser Phe Tyr
 130 135 140
 Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp
 165 170 175
 Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Ala Asp Gln Lys Ala Leu Tyr His
 180 185 190
 Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Lys
 195 200 205
 Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly
 210 215 220
 Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile
 225 230 235 240
 Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu
 245 250 255

ES 2 566 361 T3

Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met Asp
260 265 270

Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile
305 310 315 320

Pro Ser Ile Gln Ser Arg
325

<210> 41
<211> 326
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 41

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
1 5 10 15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
20 25 30

Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala
35 40 45

Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe Ala
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
100 105 110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val
115 120 125

Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe Tyr
130 135 140

ES 2 566 361 T3

Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu
145 150 155 160

Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp
165 170 175

Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Lys Ala Leu Tyr His
180 185 190

Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Lys
195 200 205

Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly
210 215 220

Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile
225 230 235 240

Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu
245 250 255

Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met Asp
260 265 270

Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile
305 310 315 320

Pro Ser Ile Gln Ser Arg
325

<210> 42
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 42

Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
1 5 10 15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
20 25 30

ES 2 566 361 T3

Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val Ala
 35 40 45
 Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
 50 55 60
 Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80
 Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile
 85 90 95
 Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
 100 105 110
 Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp Ser
 115 120 125
 Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser Phe
 130 135 140
 Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro Lys
 145 150 155 160
 Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu
 165 170 175
 Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu Tyr
 180 185 190
 Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser Lys
 195 200 205
 Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
 210 215 220
 Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys Ile
 225 230 235 240
 Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 245 250 255
 Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro Val
 260 265 270
 His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn Thr
 275 280 285

ES 2 566 361 T3

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys Pro
 290 295 300

Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn
 305 310 315 320

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg
 325

<210> 43
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 43

Met Glu Ala Arg Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu
 130 135 140

Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Ser Tyr Pro
 165 170 175

5

10

ES 2 566 361 T3

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn
 210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Leu Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380

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

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
 405 410 415

Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

ES 2 566 361 T3

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

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Ala Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

- <210> 44
- <211> 566
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Virus de la gripe

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (77)..(78)
- <223> X = cualquier aminoácido

- <400> 44

Met Lys Ala Ile Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

ES 2 566 361 T3

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Gly Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Xaa Xaa Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Val Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Ser Asn Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu
 130 135 140

Thr Thr Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Val Lys Lys Glu Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Ser Thr Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asp
 210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Leu Asn Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys

ES 2 566 361 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 45

```

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1          5          10          15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20          25          30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35          40          45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50          55          60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65          70          75          80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85          90          95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100          105          110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115          120          125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
130          135          140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145          150          155          160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
165          170          175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180          185          190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
195          200          205

Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
    
```


ES 2 566 361 T3

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 46
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 46

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe

5

10

ES 2 566 361 T3

115	120	125																		
Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Thr	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asp					
130						135					140									
Ser	Asn	Lys	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys	Pro	His	Ala	Gly	Ala	Lys	Ser					
145					150					155					160					
Phe	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Trp	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Asn	Ser	Tyr	Pro					
				165					170					175						
Lys	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val					
			180					185					190							
Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Thr	Ser	Ala	Asp	Gln	Gln	Ser	Leu					
		195					200					205								
Tyr	Gln	Asn	Ala	Asp	Thr	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Arg	Tyr	Ser					
	210					215					220									
Lys	Lys	Phe	Lys	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln					
225					230					235					240					
Glu	Gly	Arg	Met	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Asp	Lys					
				245					250					255						
Ile	Thr	Phe	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Val	Val	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe					
			260					265					270							
Ala	Met	Glu	Arg	Asn	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Ser	Asp	Thr	Pro					
		275					280					285								
Val	His	Asp	Cys	Asn	Thr	Thr	Cys	Gln	Thr	Pro	Lys	Gly	Ala	Ile	Asn					
	290					295					300									
Thr	Ser	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Ile	His	Pro	Ile	Thr	Ile	Gly	Lys	Cys					
305					310					315					320					
Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg					
				325					330					335						
Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly					
			340					345					350							
Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr					
		355					360					365								
His	His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser					
	370					375					380									

ES 2 566 361 T3

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

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

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 47
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 47

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr

ES 2 566 361 T3

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

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

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

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

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

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
 530 535 540

ES 2 566 361 T3

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

5 <210> 48
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Virus de la gripe

 <400> 48

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Ser Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

ES 2 566 361 T3

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
 210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

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

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

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

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

ES 2 566 361 T3

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 49
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 49

Met Glu Ala Arg Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

ES 2 566 361 T3

Val Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu
 130 135 140

Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn
 210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Leu Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

ES 2 566 361 T3

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380

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

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
 405 410 415

Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

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

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Ala Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

5 <210> 50
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(78)
 <223> X = cualquier aminoácido

ES 2 566 361 T3

<400> 50

Met Lys Ala Ile Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Gly Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Xaa Xaa Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Val Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Ser Asn Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu
 130 135 140

Thr Thr Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Val Lys Lys Glu Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Ser Thr Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asp
 210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln

ES 2 566 361 T3

Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
500 505 510

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

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 51
<211> 570
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Virus de la gripe

<400> 51

Met Arg Leu Val Ala Lys Leu Leu Tyr Leu Ala Val Leu Ala Ile Cys
1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile His Gly Ala Leu Thr His Pro Arg Val Thr Pro Pro
20 25 30

Val Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu Thr Gly Ala Asp Thr Tyr Glu
35 40 45

Pro Phe Leu Arg Ala Leu Gln Glu Lys Val Ile Leu Gly Asn His Thr
50 55 60

Ala Phe Asp Leu Pro Val Leu Asn Pro Glu Ser Gln Val Ser Asp Ser
65 70 75 80

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

Thr Leu Ala Ile Asp Val Val Asn Leu Tyr Val Val Ala Phe Ser Ser
100 105 110

Asn Gly Lys Ser Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Thr Ala Val Gln Arg Asp
115 120 125

Asn Leu Phe Val Asp Thr Thr Gln Glu Glu Leu Asn Phe Thr Gly Asn

5

10

ES 2 566 361 T3

130		135		140											
Tyr	Thr	Ser	Leu	Glu	Arg	Gln	Val	Gly	Phe	Gly	Arg	Val	Tyr	Ile	Pro
145					150					155					160
Leu	Gly	Pro	Lys	Ser	Leu	Asp	Gln	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Thr	Tyr
				165					170					175	
Thr	Leu	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Val
			180					185					190		
Val	Ile	Gln	Met	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Arg	Phe	Arg	Tyr	Ile	Glu	Leu
		195					200					205			
Arg	Ile	Arg	Thr	Ser	Ile	Thr	Asp	Ala	Ser	Glu	Phe	Thr	Pro	Asp	Leu
	210					215					220				
Leu	Met	Leu	Ser	Met	Glu	Asn	Asn	Trp	Ser	Ser	Met	Ser	Ser	Glu	Ile
225					230					235					240
Gln	Gln	Ala	Gln	Pro	Gly	Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	Val	Val	Gln	Leu	Arg
				245					250					255	
Asp	Glu	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Phe	Arg	Arg	Leu	Phe
			260					265					270		
Glu	Leu	Thr	Tyr	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Tyr	Gly	Cys	Ala	Pro	Val	Thr
		275					280					285			
Ser	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ala	Ile	Asp	Ala	Gln	Ile	Ile	Lys	Met
	290					295					300				
Pro	Val	Phe	Arg	Gly	Gly	Glu	Tyr	Glu	Lys	Val	Cys	Ser	Val	Val	Glu
305				310						315					320
Val	Thr	Arg	Arg	Ile	Ser	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Cys	Val	Asp	Val	Arg
				325					330					335	
Tyr	Gly	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asn	Pro	Val	Gln	Leu	Arg	Pro	Cys	Gly
			340					345					350		
Asn	Glu	Cys	Asn	Gln	Leu	Trp	Thr	Phe	Arg	Thr	Asp	Gly	Thr	Ile	Arg
		355					360					365			
Trp	Leu	Gly	Lys	Cys	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Met	Ile	Tyr	Asp
	370					375					380				
Cys	Asn	Thr	Val	Pro	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Trp	Val	Val	Ser	Ile	Asp
385					390					395					400

ES 2 566 361 T3

Gly Thr Ile Thr Asn Pro His Ser Gly Leu Val Leu Thr Ala Pro Gln
 405 410 415

Ala Ala Glu Gly Thr Ala Leu Ser Leu Glu Asn Asn Ile His Ala Ala
 420 425 430

Arg Gln Gly Trp Thr Val Gly Asp Val Glu Pro Leu Val Thr Phe Ile
 435 440 445

Val Gly Tyr Lys Gln Met Cys Leu Arg Glu Asn Gly Glu Asn Asn Phe
 450 455 460

Val Trp Leu Glu Asp Cys Val Leu Asn Arg Val Gln Gln Glu Trp Ala
 465 470 475 480

Leu Tyr Gly Asp Gly Thr Ile Arg Val Asn Ser Asn Arg Ser Leu Cys
 485 490 495

Val Thr Ser Glu Asp His Glu Pro Ser Asp Leu Ile Val Ile Leu Lys
 500 505 510

Cys Glu Gly Ser Gly Asn Gln Arg Trp Val Phe Asn Thr Asn Gly Thr
 515 520 525

Ile Ser Asn Pro Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Val Ala Gln Arg Asp
 530 535 540

Val Ser Leu Arg Lys Ile Ile Leu Tyr Arg Pro Thr Gly Asn Pro Asn
 545 550 555 560

Gln Gln Trp Ile Thr Thr Thr His Pro Ala
 565 570

<210> 52
 <211> 569
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 52

Met Lys Val Val Ala Thr Ile Leu Tyr Leu Val Val Leu Ala Ile Cys
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile His Gly Ala His Pro Thr His Ser Ala Pro Pro Thr
 20 25 30

Val Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu Thr Glu Ala Asn Ser Asn Glu

ES 2 566 361 T3

Gly Glu Asp Glu Glu Arg Cys Ser Val Val Glu Glu Val Thr Arg Arg
305 310 315 320

Ile Gly Gly Arg Asp Gly Phe Cys Ala Glu Val Lys Asn Gly Asp Glu
325 330 335

Lys Asp Gly Thr Pro Val Gln Leu Ser Ser Cys Gly Glu Gln Ser Asn
340 345 350

Gln Gln Trp Thr Phe Ser Thr Asp Gly Thr Ile Gln Ser Leu Gly Lys
355 360 365

Cys Leu Thr Thr Ser Ser Ser Val Met Ile Tyr Asn Cys Lys Val Val
370 375 380

Pro Pro Glu Ser Thr Lys Trp Val Val Ser Ile Asp Gly Thr Ile Thr
385 390 395 400

Asn Pro Arg Ser Gly Leu Val Leu Thr Ala Pro Lys Ala Ala Glu Gly
405 410 415

Thr Leu Val Ser Leu Glu Lys Asn Val His Ala Ala Arg Gln Gly Trp
420 425 430

Ile Val Gly Asn Val Glu Pro Leu Val Thr Phe Ile Val Gly Tyr Glu
435 440 445

Gln Met Cys Leu Glu Thr Asn Pro Gly Asn Asn Asp Val Ser Leu Gly
450 455 460

Asp Cys Ser Val Lys Ser Ala Ser Lys Val Asp Gln Lys Trp Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Gly Thr Ile Arg Val Asn Asn Asp Arg Ser Leu Cys Val
485 490 495

Thr Ser Glu Gly Lys Ser Ser Asn Glu Pro Ile Ile Ile Leu Lys Cys
500 505 510

Leu Gly Trp Ala Asn Gln Arg Trp Val Phe Asn Thr Asp Gly Thr Ile
515 520 525

Ser Asn Pro Asp Ser Lys Leu Val Met His Val Asp Gln Asn Asp Val
530 535 540

Pro Leu Arg Lys Ile Ile Leu Ser His Pro Ser Gly Thr Ser Asn Gln
545 550 555 560

Gln Trp Ile Ala Ser Thr His Pro Ala
565

ES 2 566 361 T3

<210> 53
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 53

```

Met Ser Phe Gln Gly His Gly Ile Tyr Tyr Ile Ala Ser Ala Tyr Val
1          5          10

Ala Asn Thr Arg Leu Ala Leu Ser Glu Asp Ser Ser Ala Asn Lys Ser
20          25          30

Pro Asp Val Ile Ile Ser Ser Asp Ala Val Asp Pro Leu Asn Asn Leu
35          40          45

Trp Leu Ile Glu Pro Val Gly Glu Ala Asp Thr Tyr Thr Val Arg Asn
50          55          60

Ala Phe Ala Gly Ser Tyr Met Asp Leu Ala Gly His Ala Ala Thr Asp
65          70          75          80

Gly Thr Ala Ile Ile Gly Tyr Arg Pro Thr Gly Gly Asp Asn Gln Lys
85          90          95

Trp Ile Ile Ser Gln Ile Asn Asp Val Trp Lys Ile Lys Ser Lys Glu
100         105         110

Thr Gly Thr Phe Val Thr Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Gly Thr Gly
115         120         125

Thr Val Val Gly Trp Gln Asn Ile Thr Asn Asn Thr Ser Gln Asn Trp
130         135         140

Thr Phe Gln Lys Leu Ser Gln Thr Gly Ala Asn Val His Ala Thr Leu
145         150         155         160

Leu Ala Cys Pro Ala Leu Arg Gln Asp Phe Lys Ser Tyr Leu Ser Asp
165         170         175

Gly Leu Tyr Leu Val Leu Thr Arg Asp Gln Ile Ser Ser Ile Trp Gln
180         185         190

Ala Ser Gly Leu Gly Ser Thr Pro Trp Arg Ser Glu Ile Phe Asp Cys
195         200         205
    
```

ES 2 566 361 T3

Asp Asp Phe Ala Thr Val Phe Lys Gly Ala Val Ala Lys Trp Gly Asn
 210 215 220

Glu Asn Phe Lys Ala Asn Gly Phe Ala Leu Leu Cys Gly Leu Met Phe
 225 230 235 240

Gly Ser Lys Ser Ser Gly Ala His Ala Tyr Asn Trp Phe Val Glu Arg
 245 250 255

Gly Asn Phe Ser Thr Val Thr Phe Phe Glu Pro Gln Asn Gly Thr Tyr
 260 265 270

Ser Ala Asn Ala Trp Asp Tyr Lys Ala Tyr Phe Gly Leu Phe
 275 280 285

<210> 54
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 54

Met Ser Phe Glu Gly His Gly Ile Tyr His Ile Pro His Ala His Val
 1 5 10 15

Ala Asn Ile Arg Met Ala Leu Ala Asn Arg Gly Ser Gly Gln Asn Gly
 20 25 30

Thr Pro Val Ile Ala Trp Asp Ser Asn Asn Asp Ala Phe Asp His Met
 35 40 45

Trp Leu Val Glu Pro Thr Gly Glu Ala Asp Thr Tyr Thr Ile His Asn
 50 55 60

Val Ser Thr Gly Thr Tyr Met Asp Val Thr Ala Ser Ala Val Ala Asp
 65 70 75 80

Asn Thr Pro Ile Ile Gly Tyr Gln Arg Thr Gly Asn Asp Asn Gln Lys
 85 90 95

Trp Ile Ile Arg Gln Val Gln Thr Asp Gly Gly Asp Arg Pro Trp Lys
 100 105 110

Ile Gln Cys Lys Ala Thr Gly Thr Phe Ala Thr Leu Tyr Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Thr Ala Ile Val Gly Trp Arg Leu Val Asn Ser Asn Gly

ES 2 566 361 T3

Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
 50 55 60

Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe Ala
 85 90 95

Glu Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
 100 105 110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val
 115 120 125

Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe Tyr
 130 135 140

Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu
 145 150 155 160

Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp
 165 170 175

Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Ala Ala Gln Lys Thr Leu Tyr His
 180 185 190

Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Lys
 195 200 205

Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly
 210 215 220

Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile
 225 230 235 240

Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu
 245 250 255

Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met Asp
 260 265 270

Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile

ES 2 566 361 T3

Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Lys
 195 200 205

Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly
 210 215 220

Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile
 225 230 235 240

Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu
 245 250 255

Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met Asp
 260 265 270

Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile
 305 310 315 320

Pro Ser Ile Gln Ser Arg
 325

<210> 57
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 57

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
 1 5 10 15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
 20 25 30

Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala
 35 40 45

Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
 50 55 60

Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

ES 2 566 361 T3

Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe Ala
 85 90 95
 Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
 100 105 110
 Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val
 115 120 125
 Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Asn Ser Phe Tyr
 130 135 140
 Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp
 165 170 175
 Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Ala Asp Gln Lys Thr Leu Tyr His
 180 185 190
 Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Lys
 195 200 205
 Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly
 210 215 220
 Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Pro Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile
 225 230 235 240
 Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu
 245 250 255
 Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met Asp
 260 265 270
 Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285
 Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300
 Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile
 305 310 315 320
 Pro Ser Ile Gln Ser Arg
 325

ES 2 566 361 T3

<211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 58

```

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
1          5          10          15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
20          25          30

Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala
35          40          45

Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
50          55          60

Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val
65          70          75          80

Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe Ala
85          90          95

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
100         105         110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val
115         120         125

Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe Tyr
130         135         140

Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu
145         150         155         160

Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp
165         170         175

Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Lys Ala Leu Tyr His
180         185         190

Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Lys
195         200         205

Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly
210         215         220
    
```

10

ES 2 566 361 T3

Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile
 225 230 235 240

Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu
 245 250 255

Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met Asp
 260 265 270

Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile
 305 310 315 320

Pro Ser Ile Gln Ser Arg
 325

5 <210> 59
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (203)..(203)
 <223> X = cualquier aminoácido

15 <400> 59

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

ES 2 566 361 T3

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe
 100 105 110
 Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140
 Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe
 145 150 155 160
 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
 165 170 175
 Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Val Xaa Gln Lys Thr Leu Tyr
 195 200 205
 Arg Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220
 Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
 225 230 235 240
 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255
 Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 260 265 270
 Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285
 Asp Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300
 Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320
 Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335
 Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe

ES 2 566 361 T3

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe
 100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160

Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
 165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Lys Ala Leu Tyr
 195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220

Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
 225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285

Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro

ES 2 566 361 T3

<210> 61
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 61

```

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1          5          10          15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
          20          25          30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
          35          40          45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50          55          60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65          70          75          80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
          85          90          95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
          100          105          110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
          115          120          125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Gly Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
          130          135          140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
          145          150          155          160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
          165          170          175

Leu Ser Met Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
          180          185          190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
          195          200          205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
    
```

ES 2 566 361 T3

210						215									220
Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Glu
225					230					235					240
Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu	Leu	Glu	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile
				245					250					255	
Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Trp	Tyr	Ala	Phe	Ala
			260					265					270		
Leu	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Pro	Met
		275					280					285			
Asp	Glu	Cys	Asp	Ala	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser
290						295					300				
Ser	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	His	Pro	Val	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro
305					310					315					320
Lys	Tyr	Val	Arg	Ser	Ala	Lys	Leu	Arg	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn
				325					330					335	
Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe
			340					345					350		
Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His
		355					360					365			
His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Lys	Ser	Thr
370						375					380				
Gln	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile	Glu
385					390					395					400
Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys	Leu
				405					410					415	
Glu	Arg	Arg	Met	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Val	Asp	Asp	Gly	Phe	Leu
			420					425					430		
Asp	Ile	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Glu
		435					440						445		
Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Glu	Lys
450						455					460				
Val	Lys	Ser	Gln	Leu	Lys	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys
465					470					475					480

ES 2 566 361 T3

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

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

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 62
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 62

Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr Ala
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
 20 25 30

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
 35 40 45

Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Thr Ala
 50 55 60

Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Ala
 85 90 95

Glu Thr Pro Asn Pro Lys Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu

5

10

ES 2 566 361 T3

115	120	125																			
Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Asp	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Thr	Val						
130						135					140										
Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Ala	Ser	Cys	Ser	His	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe						
145					150					155					160						
Tyr	Lys	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Glu	Lys	Asn	Gly	Leu	Tyr	Pro	Asn						
				165					170					175							
Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Val	Asn	Lys	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu						
			180					185					190								
Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Asn	Met	Gly	Asp	Gln	Arg	Ala	Ile	Tyr						
		195					200					205									
His	Lys	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val	Ser	Val	Leu	Ser	Ser	His	Tyr	Ser	Arg						
	210					215					220										
Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Glu						
225					230					235					240						
Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu	Leu	Glu	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile						
				245					250					255							
Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Trp	Tyr	Ala	Phe	Ala						
			260					265					270								
Leu	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Met						
		275					280					285									
Gly	Glu	Cys	Asp	Ala	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser						
	290					295					300										
Ser	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	His	Pro	Val	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro						
305					310					315					320						
Lys	Tyr	Val	Arg	Ser	Thr	Lys	Leu	Arg	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn						
				325					330					335							
Val	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe						
			340					345					350								
Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly	Met	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His						
		355					360					365									
His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Lys	Ser	Thr						
	370					375					380										

ES 2 566 361 T3

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Glu
 385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Arg Leu
 405 410 415

Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430

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

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asp Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

Val Lys Thr Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Lys Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

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

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
 565

5 <210> 63
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Virus de la gripe

<400> 63

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly His His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr

ES 2 566 361 T3

Met Gly Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile
 385 390

<210> 64
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Virus de la gripe

10

<400> 64

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
 1 5 10 15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
 20 25 30

Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala
 35 40 45

Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
 50 55 60

Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

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

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante del polipéptido de hemaglutinina (“HA”) de la gripe H1 HA obtenida por ingeniería genética cuya secuencia de aminoácidos muestra al menos un 90 % de identidad con un polipéptido HA de H1 de tipo silvestre de referencia que es el HA de la cepa A/California/04/2009, cuya secuencia de aminoácidos incluye:
- 10 un resto en una posición correspondiente al resto 186 de HA de H3 de tipo silvestre, siendo dicho resto Pro;
un resto en una posición correspondiente al resto 189 de HA de H3 de tipo silvestre, siendo dicho resto Thr; y
un resto en una posición correspondiente al resto 227 de HA de H3 de tipo silvestre, siendo dicho resto Ala.
- 15 2. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido HA de H1 obtenido por ingeniería genética demuestra una mayor unión a glicanos con topología de tipo sombrilla en comparación con un polipéptido HA de H1 de tipo silvestre.
- 20 3. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido HA de H1 obtenido por ingeniería genética demuestra una unión aumentada al menos 2 veces a los glicanos con topología de tipo sombrilla en comparación con un polipéptido HA de H1 de tipo silvestre.
- 25 4. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido HA de H1 obtenido por ingeniería genética provoca que un virus de la gripe demuestre una mayor infectividad de seres humanos en comparación con un polipéptido HA de H1 de tipo silvestre.
- 30 5. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, formulado como una composición farmacéutica.
- 35 6. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica es una composición de vacuna que comprende un virus atenuado vivo, o que comprende partículas similares a virus, o que es una vacuna de subunidad.
- 40 7. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 45 8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 7, que es un agente de interferencia ya que compite con interacciones de unión entre la variante del polipéptido HA de H1 obtenido por ingeniería genética y un glicano con topología de tipo sombrilla.
- 50 9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, formulado como una composición farmacéutica.
- 55 10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 9, en el que la composición farmacéutica es una composición de vacuna.
- 60 11. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 10, en el que la composición de vacuna comprende un virus atenuado vivo, o en el que la composición de vacuna comprende partículas similares a virus, o en el que la composición de vacuna es una vacuna de subunidad o comprende un adyuvante.
- 65 12. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para su uso en el tratamiento, prevención, diagnóstico o estratificación de pacientes que padecen o son susceptibles de padecer una infección gripal.
13. Uso de la variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para diagnosticar o estratificar pacientes que padecen o son susceptibles de padecer una infección gripal.
14. Un método para estratificar pacientes que padecen o son susceptibles de padecer una infección gripal, en el que la variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 se usa en un método que comprende:
- proporcionar una población de pacientes;
poner en contacto una muestra de sangre de cada uno de los pacientes en la población con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11;
determinar si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a una variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la sangre de cada paciente; y

determinar que, si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a una variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética en la sangre de un paciente:

5 el paciente estará protegido frente a una cepa de gripe que demuestra una mayor unión a seres humanos o infectividad tras la administración de una vacunación contra A/South Carolina/1/1918 o A/Swine/Iowa/15/1930; o el paciente será menos susceptible a la infección por una cepa de gripe que demuestra una mayor unión o infectividad en seres humanos; o el paciente demostrará una menor necesidad de vacunación o tratamiento que los pacientes no expuestos previamente.

10 15. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos incluye además una o más sustituciones de secuencia con respecto a la referencia en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 98, 136, 137, 138, 145, 153, 155, 156, 159, 183, 187, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 215, 217, 222, 225, 226, 228, y combinaciones de los mismos, correspondientes a las posiciones en la secuencia de HA de H3 de tipo silvestre.

16. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 15, en la que en la variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética el resto en la posición 145 se selecciona del grupo que consiste en: Ser y Asn.

17. La variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 15, en el que en la variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética el resto en la posición 219 es Lys.

18. La variante del polipéptido de HA H1 obtenida por ingeniería genética de la reivindicación 15, en el que en la variante del polipéptido HA de H1 obtenida por ingeniería genética el resto en la posición 225 se selecciona del grupo que consiste en: Asn, Gly y Glu.

	97	139	153	183
H1_Av	ENGTCPGEFIDYEEIREFQ	SSSEFEKFEIFFKASSWP	HETTKGVTAACSYS-GASSFYRNLLMI	TKKG-TS-YPKLSKSYTNNK
H1_Hu1	ENGTCPGDFIDYEEIREFQ	SSVSSEFEKFEIFFKTS	SSWPNETTKGVTAACSIA-GASSFYRNLLML	TKKG-SS-YPKLSKSYVNNK
H1_Hu2	ENGTCPGPFADYEEIREFQ	SSVSSEFERFEIFFKSSWP	NHTVT-CVSAOSHN-GKSSFYRNLLML	TKKN-GL-YPNLSKSYVNNK
H2_Av	ANGICYPGSFNDYEEIKH	LTSVTHFEKVKILPR-DQW	QHTTGG-SRACAVS-GNEFFRNNVML	TEKG-SN-YPYAKRSYNN
H2_Hu	RDGICYPGSFNDYEEIKH	LSSVHFEKVKILPK-DRW	QHTTGG-SRACAVS-GNEFFRNNVML	TEKG-SN-YPYAKRSYNN
H3_Av	FS-NCYPYDIPDYASIR	SLVASSGILEFITEG---FTW-TGVTQNG	SSACKRG-PANGFFSRLNML	TKS--ESAYPVLNV
H3_Hu1	FS-NCYPYDYPDYASIR	SLVASSGILEFITEG---FTW-TGVTQNG	SSACKRG-PGSGFFSRLNML	TKS--GSTYPVLNV
H3_Hu2	YS-NCYPYDYPDYASIR	SLVASSGILEFNES---FNW-AGVTQNG	TSACKRR-SNKSFFSRLNML	THL--KYKYPALNV
H4_Av	VD-TCYPFDYDQYQIR	SILANNGKFEIAEE---FQW-NTVKQNG	KSACKRA-NWNDFFRNML	TKSN-GDAYPLQNL
H5_Av1	VNDICYPGDFNDYEEIKH	LSRINHFEKIQIIPK-SSWS	HEASLGVSACFIQ-GKSSFFRNVML	IKKN-ST-YPTIKRSYNN
H5_Av2	ANDLICYPGDFNDYEEIKH	LSRINHFEKIQIIPK-NSWS	HEASLGVSACFIQ-GKSSFFRNVML	IKKN-NA-YPTIKRSYNN
H6_Av	QNGICYPGILNEIEELK	ALIGGERIERFEMPEK-STWS	GVNNGVTRACEDN-SGSSFYRNLLMI	TKNSAA-YPVLIKGT
H7_Av	SD-VCYPKFNVEEAIKQ	LIRESGGINKETMG---FTY-SCIR	TNGATSTCFRRS-G-SSFYAEMK	LLSNTDMAAF
H8_Av	PEGWCYPGSVENLEEIR	FVSSAASYKRIRLFDY-SRWN--VTR	SGTSAONASTGGQSFYRS	INMLTKKYPDT-YDFNE
H9_Av	VNGTCYPGNVENLEEIR	TLFSSASSYQRIQIFED-TIWN--VTY	TCTSKAQS-----GSFYRS	FMLTQK-SGS-YPVQDAQ
H10_Av	IA-YCYPGATVNEEAIKQ	IMESGGIDKISTG---FTY	GSSINSAGTTRSORRS-GGNSFYAEL	KMLVSKNKGQNFQANTYR
H11_Av	TNGICYPGTLENEEELR	LKFSGVLEFSKFEAFTS-NGW	AVNSGAGVTAACKFG-SSNS	FFRNNMLIH-QSGT-YPVIR
H12_Av	MEGVCYPGSLENQEEI	LSLFSSIKKYERVKMDF-TKWN--VTY	TGTSRACNNTSRGSGFYRS	FMMLTLK-SGQ-FPVQ
H13_Av	PHGICYPGELNNGEIR	HLFSGIRFSRTELI	FP-TSWGEVLD--GATS	ACRDDKINSFYRNLM
H14_Av	VD-TCYPFDYDQYQIR	SILASSGLEFFIAEQ---FTW-NG	VKDCSSSACIRG-GRNS	FFSRLNMLTKET-NGNY
H15_Av	SD-ICYPGKFTNEEAIKQ	LIRESGGIDKEPMG---FRY-SG	LKTDGATSAKRT-V-SSFY	SEMMLSSRANQVFPQINQ
H16_Av	PNKICFPGEILDNNGEIR	HLFSGVNSFSRTELI	SP-NKWDILD--GV	TASQRDN-GASSFYRN

FIG. 1A

H1_Av AYVSVGSSKYNRRRPAPEIAARPEVVRGQAGRMVYWTLLDQGDITTFEATGNLIAPWYAFALNKGSD-----SGIITS-DAPVH-NCDFRCQTPHGAUNSLPFFQNVHPIT
H1_Hu1 AYVSVGSSKYNRRRFPPEIAARPKVRDQAGRMVYWTLLLEPGDITTFEATGNLIAPWYAFALNRGSG-----SGIITS-DAPVH-DCNTKCCQTPHGAUNSLPFFQNVHPVT
H1_Hu2 AYVSVSSHYSRRRFPPEIAAKRPKVRDQGRINYYWTLLLEPGDITTFEANGWLIAPWYAFALSFGFG-----SGIITS-NAPMD-ECDKAKCQTPQGAUNSLPFFQNVHPVT
H2_Av TYVSVGTSTLNKRSPPEIATRPKVNQGGRRMEFSWTLLETWDVINFESTGNLIAPEYGFKISKRGS-----SGIMKT-EXTLE-NCEYKCCQTPLGAINITLPPFHNHPIT
H2_Hu TYVSVGTSTLNKRSPDIATRPKVNGLSRRMEFSWTLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGS-----SGIMKT-EXTLE-NCEYKCCQTPLGAINITLPPFHNHPIT
H3_Av GRVTVSTRSQTIIPNIGSRPWRGQPRISIIYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTG-----KSSIMRS-DAPID-TCISFCITPNGSPNDKPFQNVNKIT
H3_Hu1 GRVTVSTRSQTIIPNIGSRPWRGLSSRISIIYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTG-----KSSIMRS-DAPID-TCISFCITPNGSPNDKPFQNVNKIT
H3_Hu2 GRITVSTRSQTIIPNIGYRPRVRDISSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSG-----KSSIMRS-DAPIG-KCNSECITPNGSPNDKPFQNVNRT
H4_Av GRVTVTKTSQTSVVPNIGSRPWRGQSGRISFYWTIVDPGDIVFNTIGNLIAPRGHYKLNQK-----KSTILNT-AVPIG-SCVSKCHTDRGSITTKPFQNVSRIS
H5_Av1 TYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNQSGRRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYVAYKIVKKGD-----STIMKS-ELEYG-NCNTKCCQTPNGAUNSMPPFHNHPIT
H5_Av2 TYISVGTSTLNQRLVPKIAATRSKVNQNGRRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYVAYKIVKKGD-----SAIMKS-ELEYG-NCNTKCCQTPNGAUNSMPPFHNHPIT
H6_Av RYVRMGTESMNAKGEISARPVVNGQRGRIDYIYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKIVFVSTNSK-----GAVFKS-NLPIE-NCDATCQTIAGVLRNKTKTFQNVSPLV
H7_Av KLITVSSNYQQSFVSPGAREKVDGQSGRIDFHWLMLNPNDTITFESNGAFIAPDRASFIR-----GKSMGIQS-GVQVDDNCEGDCYHSGGTIISNLPFQNVNSRA
H8_Av TLSSVTNTINRSFQNIQPRPLVRLGQGRMDYWGILKRGETLKIRTINGNLIAPFEGYLLKGESY-----GRIIQMEDIPIG-NCNTKCCQTYAGAUNSKPFFQNASRHY
H9_Av TTTSVTEDLNRIKFPVIGPRPLVNLQGRINYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYGHVLSGGSH-----GRILKT-DLNSG-NCVVQCCQTEKGGNLSLPPFHNISKYA
H10_Av LSISVGSSTYQNNFVVGARPQVNGQSGRIDFHWITWVQPDNITFESHNGGLIAPSRVSKLK-----GRGLGIQS-GASVDNDCESKCFWKGGINTKLPFQNVLSPRT
H11_Av SYVAVDSEYNRRFPPEISTRPKVNGQAGRMFYWTIVKPGFAITFESNGAFIAPRYAFELVSLGN-----GKLFRS-DLNIE-SCSTKCCQSEIGGINPNSRFFHNVRNT
H12_Av TLSSVTDEINRSFKENIGPRPLVRLGQGRMDYIYWAIVLKPGQTVKIQTNGNLIAPYGHLLITGKSH-----GRILKN-NLPVG-QCVTECQLNEGVWMTSKPFFQNTSKHY
H13_Av PYTIIVSTKSWSEKYKLETVVRPVGNGQRSMKIYWSLLHPGEMITFESNGGLIAPRYGIIIEEYK-----GRIFQS-RIRMS-KCNTKCCQTSVGGINTNRTFQNVIDKNA
H14_Av GRVTVSTRSQDISIVPNIGSRPVRNQSGRISIIYWTIVNPGDSIIFNSIGNLIAPRGHYKISKST-----KSTVLKS-DARIG-SCTSFCITDKGSIQSDKPFQNVSRIA
H15_Av KLITVGSKYQQSFSPGDRPKVNGQAGRIDFHWLMLDQDVTVTFIFNGAFIAPDRATFLRSNAPSGVEYNGSLGIQS-DAQIDESCEGCFYSGGTINSPLPFFQNVDSWA
H16_Av PYTIIVSTKSWSKRYELEIGTRIG-DGQRSWMLYWHLMRPERIMFESNGGLIAPRYGIIIEKYCI-----GRIFQS-GVRMA-KCNTKCCQTSIGGINPNTKTKTFQNIERNA

FIG. 1B

324

333

H1_Av IGECPKYVKSTKLRMATGLRNVPISIQ-----SRGLFCAIAGFTIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITSKVN5VIEKMNTQFTAVGKEFNWLERRIENLN
H1_Hu1 IGECPKYVRSTKLRMATGLRNIPISIQ-----SRGLFCAIAGFTIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITSKVN5VIEKMNTQFTAVGKEFNWLERRIENLN
H1_Hu2 IGECPKYVRSKLRMTGLRNIPISIQ-----SRGLFCAIAGFTIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVN5VIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLN
H2_Av IGECPKYVKSRLVLATGLRNVPQIE-----SRGLFCAIAGFTIEGGWQHGVDGWYGYHHSNDQSGSYAADKSTQKADIDGITNKVN5VIEKMNTQFEAVGKEFNWLERRIENLN
H2_Hu IGECPKYVKSRLVLATGLRNVPQIE-----SRGLFCAIAGFTIEGGWQMGIDGWYGYHHSNDQSGSYAADKSTQKAFDGITNKVN5VIEKMNTQFEAVGKEFNSLERRIENLN
H3_Av YGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPK-----QTRGLFCAIAGFTIENGWEGMIDGWYGFRRHQNSEGTQAAADLKSTQAAIDQINRKLNRVIEKTNKTFHQIEKEFSEVEGRIQDLE
H3_Hu1 YGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPK-----QTRGLFCAIAGFTIENGWEGMIDGWYGFRRHQNSEGTQAAADLKSTQAAIDQINGKLNRVIEKTNKTFHQIEKEFSEVEGRIQDLE
H3_Hu2 YGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPK-----QTRGLFCAIAGFTIENGWEGMVDGWYGFRRHQNSEGTQAAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNKTFHQIEKEFSEVEGRIQDLE
H4_Av IGDCPKYVKQSLKLATGMRNIPK-----ATRGLFCAIAGFTIENGWQGLIDGWYGFRRHQNAEGTGAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNKTFHQIEKEFEQVEGRIQDLE
H5_Av1 IGECPKYVKSRLVLATGLRNVPQRERRRKRGLFCAIAGFTIEGGWQMGVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKSTQKADIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNWLERRIENLN
H5_Av2 IGECPKYVKSRLVLATGLRNVPQRERRRKRGLFCAIAGFTIEGGWQMGVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKSTQKADIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNWLERRIENLN
H6_Av IGKCPKYVKSRLATGLRNVPQIA-----TRGLFCAIAGFTIEGGWTELDGWYGYHHNSQSGSYAADRESTQKADIDGITNKVN5IIDKMNTQFEAVDHEFSNLERRIDNMN
H7_Av VGCCKYVVKQESLMLATGKNVPEIP---KGRGLFCAIAGFTIENGWEGMIDGWYGFRRHQNAQEGETAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQFELIDNEFFEVEKQIGNVI
H8_Av MGCCKYVVKASRLAVGLRNTPSVE-----PRGLFCAIAGFTIEGGWSGMIDGWYGFRRHNSSEGTGMAADQKSTQEAIDKITNKVNNIVDKMNRFEFVNNHEFSEVEKRIIMNIN
H9_Av FGICPKYVRVSKLAVGLRNVPARS-----NRGLFCAIAGFTIEGGWPLVAGWYGFQHSNDQGVMAADRSTQRAIDKITSKVNNIVDKMKNQYELIDHEFSEVETRLNMIN
H10_Av VGQCPKYVVKESLLLATGMRNVPVV---QGRGLFCAIAGFTIENGWEGMVDGWYGFRRHQNAQGTQAAADYKSTQAAIDQITGKLNRLIEKTNTEFESIESEFSEIEHQIGNVI
H11_Av IGDCPKYVNVSKLKLATGLRNVPPIA---TRGLFCAIAGFTIEGGWPLINGWYGFQHRNEEGTGAADKSTQKADIDQITSKVNIVDRMNTNFSVQHEFSEIEERINQLS
H12_Av IGKCPKYIPSGSLKLATGLRNVPQVQ-----NRGLFCAIAGFTIEGGWPLVAGWYGFQHQNAEGTGAADRSTQKADIDNNQNKLNVIIDKMKNQFEVNNHEFSEVESRINMIN
H13_Av IGDCPKYIKSGQLKLATGLRNVPAPIS-----NRGLLCAIAGFTIEGGWPLINGWYGFQHQNEQGTGLAADKSTQKADIDQITTKINNIIDKMNGVYDSIRGEFNQVEKRINMLA
H14_Av IGNCPKYVKQSLMLATGMRNIPK-----QAKGLFCAIAGFTIENGWQGLIDGWYGFRRHQNAEGTGAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNKTFHQIEKEFEQVEGRIQDLE
H15_Av VGCCKYVVKQSSPLAIGHKNVPEKI---HTRGLFCAIAGFTIENGWEGMIDGWYGFRRHQNAQGGTAADYKSTQAAIDQITGKLNRLIEKTNQFELIDNEFFEVEQQIGNVI
H16_Av IGDCPKYIKSGQLKLATGLRNVPVSG---ERGLFCAIAGFTIEGGWPLINGWYGFQHQNEQGTGLAADKSTQKADIDEITTKINNIIEKMNGVYDSIRGEFNQVEKRINMLA

FIG. 1C

FIG. 2A

98 136 153

Subtipo H1	:	:
ADA76	SYIIETNSENGTCY PGEFIDYEELREQLSSISSEFEKFEI FPKASSWPNHETTKGV TAACSYSGASSFYRNLL MLTKKGTSY	:
ASI30	SYIVETNSDNGTCY PGDFIDYEELREQLSSVSSFEKFEI FPKTSWPNHETTRGV TAACPYAGASSFYRNLL MLVKKGNSY	:
APR34	SYIVETPNSENGIC Y PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI FPKESWPNHNTNG-V TAACSHHEGKSSFYRNLL MLTEKEGSSY	:
ASC18	SYIVETNSENGTCY PGDFIDYEELREQLSSVSSFEKFEI FPKTSWPNHETTKGV TAACSYAGASSFYRNLL MLTKKGSSY	:
AT91	SYIAETPNPENGTCY PGYFADYEELREQLSSVSSFERFEI FPKESWPNHTVTKGV TSCSHNGKSSFYRNLL MLTKKNGLY	:
ANY18	SYIVETNSENGTCY PGDFIDYEELREQLSSVSSFEKFEI FPKTSWPNHETTKGV TAACSYAGASSFYRNLL MLTKKGSY	:
Subtipo H3		
ADU63	DLFVERSNAFS-NCY PYDIPDYASLRSLVASSGTLEFITEG----FTWTGVTQNGG SSACKRGPANGFFSRLN MLTKSESAY	
AAI68	DLFVERSKAFS-NCY PYDVPDYASLRSLVASSG--TLEFITEGFTWTG-VTQNGG SNACKRGPAGGFFSRLN MLTKSGSTY	
AM99	DLFVERSKAYS-NCY PYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNES----FNWTGVAONGT SSSCKRRS IKSFFSRLN MLHOLKYRY	
Subtipo H5		
ADS97	SYIVEKDNVPVNGLCY PENFNFDYEELKHL LSS TNHFEKIRI IPR-SSWSNHDASSGV SSACPYNGRSSFFRN V MLTKKNAY	
Viet04	SYIVEKANPVNDLCY PGDFNDYEELKHL LSS RNHFEKIQI IPK-SSWS SHEASLGV SSACP YQKSSFFRN V MLTKKNSTY	

183 190 222 226

Subtipo H1	:	:	:
ADA76	PKLSKSYTNNKGGKEVLLWGVHHPPSVSEQQSLYQNADAYVSVGSSKYNRRFAPEIAARPEVRRGQAGRMNYYWTLLEDQGDIT		
ASI30	PKLSKSYVNNKGGKEVLLWGVHHPPSTDDQQSLYQNADAYVSVGSSKYDRRFTPEIAARPKVRSQAGRMNYYWTLLEPGDIT		
APR34	PKLKNSYVNNKGGKEVLLWGVHHPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMNYYWTLLEKPGDIT		
ASC18	PKLSKSYVNNKGGKEVLLWGVHHPPPTGIDQQSLYQNADAYVSVGSSKYNRRFTPEIAARPKVRDQAGRMNYYWTLLEPGDIT		
AT91	PNVSKSYVNNKGGKEVLLWGVHHPPSNISDQRAIYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLEPGDIT		
ANY18	PKLSKSYVNNKGGKEVLLWGVHHPPPTGTDQQSLYQNADAYVSVGSSKYNRRFTPEIAARPKVRDQAGRMNYYWTLLEPGDIT		
Subtipo H3			
ADU63	PVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPPSTNQEQTNLVYQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIGSRPWRGQPGRISIIYWTIVKPGDVL		
AAI68	PVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPPSTNQEQTSLVYQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIGSRPWRGIISSRISIIYWTIVKPGDVL		
AM99	PALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPPSTDSDQTSLSLTQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWRGIISSRISIIYWTIVKPGDIL		
Subtipo H5			
ADS97	PTIKRSYNNNTNQEDLLILWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYVSVGTSSTLNQRSVPEIATRPKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAI		
Viet04	PTIKRSYNNNTNQEDLLYLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAI		

FIG. 2B

FIG. 3A

	97	139	153	183
H1_Av	ENGICYPGEEFDYEEELREQLSSISSEFEI	FPKASSPWHETTKGTAACSYS-GASSFYRNLI	MTKKG-TS-YPKLSKSYNNKGEVVLVWG	WHHEFSVSEQOSLYQAD
H1_Hu1	ENGICYPGDFDYEEELREQLSSVSSFEFEI	FPKSSWPWHETTKGTAACSVA-GASSFYRNLI	MTKKG-SS-YPKLSKSYNNKGEVVLVWG	WHHEFTGTDDQOSLYQAD
H1_Hu2	ENGICYPGYFADYEEELREQLSSVSSFEFEI	FPKSSWPWHETTKGTAACSVA-GASSFYRNLI	MTKGN-GL-YPNLSKSYNNKGEVVLVWG	WHHEPNIGDQRALYHTEN
H2_Av	ANGICYPGSENDYEEELKHLITSVTHFEKVI	LPR-DQWTOHTTGG-SRACAVS-GNPSFFRN	MWLTEKG-SN-YPIAKRSYNNNTSGQMLV	WJG-IHHEPNDTTEQRTLYQNVG
H2_Hu	RDGICYPGSFNDYEEELKHLISSVKHFEKVI	LPLK-DRWTQHTTGG-SRACAVS-GNPSFFRN	MWLTEKG-SN-YPVAKGSYNNNTSGQMLI	WJG-WHHEPNDTTEQRTLYQNVG
H3_Av	FS-NCYFYDIPDYASLSRLVASSGTLFEIT	EG---FTW-TGVTQNGSSACKRG-PANGFFSR	LNMTKS--ESAYPVLNVTMENNDFDKLY	WJG-WHHEPSTNQEQDLYVQAS
H3_Hu1	FS-NCYFYDVPDYASLSRLVASSGTLFEIT	EG---FTW-TGVTQNGSSACKRG-PGSGFFSR	LNMTKS--GSTYPVLNVTMENNDFDKLY	WJG-IHHEPSTNQEQDLYVQAS
H3_Hu2	YS-NCYFYDVPDYASLSRLVASSGTLFEIN	NES---FNW-AGVTQNGSSACKRR-SNKSFFSR	LNMTLHL--KYKYPALNVTMENNDFDKLY	WJG-WHHEPVTDSDDQLSLYAQAS
H4_Av	VD-ICYFDFDVPDYQSLRSILANNGKFEFL	AEE---FQW-NIVKQNGKSGACKRA-NWDDFF	NRINMTKSN-GDAYPLQNLTKVNGDYARLY	WJG-WHHEPSTDTTEQDLYKNNP
H5_Av1	VNDICYPGDNDYEEELKHLISRLNHFEKI	QIIPK-SSWSSHEASIGVSSACPQ-GKSSFFRN	VNMLIKKN-ST-YPTIKRSYNNNTQEDLLV	WJG-IHHEPNDAAEQTKLYQNP
H5_Av2	ANDICYPGDNDYEEELKHLISRLNHFEKI	QIIPK-NSWSSHEASIGVSSACPQ-GKSSFFRN	VNMLIKKN-NA-YPTIKRSYNNNTQEDLLV	WJG-IHHEPNDAAEQTKLYQNP
H6_Av	QNGICYPGTINEIEEELKALIGSERIERF	EMFPK-STWSGVNTNNGVTRACPEN-SGSSFYRN	LIWTKTNSAA-YPVIKGTYNNTGQPIIYFWG	WHHEPDTNAQNNLYGSGD
H7_Av	SD-NCYPGKFNEEALRQIIRRESGGINK	ETMG---FTY-SCIRTNGATSTCRRS-G-SSFYA	EMWLLSNTDNAAFPQMTSKYKNTKRDPA	LIWJG-IHHSSTTEQTKLYGSGN
H8_Av	PEGICYPGSVENLEELRFVSSAASYKRI	RLFDY-SRWN--VYRSGTSKACNASTGGQSF	YRSINWTKKKPDT-YDFNEGAYVNNEDG	DIIFWJG-IHHEPDTKEQTKLYKMAN
H9_Av	VNGICYPGNVENLEELRTLFSSASSYQRI	QIFPD-TIWN--VYTYGTSKACS----GSFYR	SMWLTQK-SGS-YPVQDAQVYNNREKSI	LFWJG-IHHEPDTTAQTNLYINFD
H10_Av	IA-ICYPGATVNEEALRQIMESGIDKISTG	---FTYGSINSAGTTRSCMBS-GGNSFYA	ELWLVSKNKGQNEPQTANTYRNTDSA	EHLIIFWJG-IHHSSTQEKNDLYGTQS
H11_Av	TNGICYPGTLENEEELRLKFGVLEFSK	FEAFTS-NGWGAIVNSGAGVTAACKFG-SSNS	FFRNMLIHLI-OSGT-YPVIRRFNNTKGR	DVLYVWJG-WHHEPATLKEHQDLYKKDS
H12_Av	MEGICYPGSIEHQEELRSLFSSIKKYER	VKMFDE-TKWN--VYTYGTSRACUNTSNRG	SFYRSMWLTIK-SGQ-PPVQVTEYKNT	RSDSILFWJG-IHHEPPTSAEQVQLYKNPD
H13_Av	PHGICYPGEIANNCELRHLFSGIRSF	SRTLELIPP-TSWGEVLD--GATSA	CKDDKGTNSFYRNLMFWVK-KNNR-YPVI	SKTYNNNTTGRDVLVWJG-IHHEPVSVEETKLYVNSD
H14_Av	VD-ICYFDFDVPDYQSLRSILASSGSL	FEFLAEQ---FTW-NGVKVDGSSACLIRG-GR	NSFFSRNLMTKET-NGNYGPINVT	KENTGSVRRLYVWJG-WHHEPSSDNEQDLYKVAT
H15_Av	SD-ICYPGKFTNEEALRQIIRRESGGIDK	EPMG---FRY-SGIKTDGATSAKRT-V-SSFY	SEMWLLSSKANQVFPQLNQTNRN	KXPALIFWJG-WHHSLSLDEQNKLYGAGN
H16_Av	PNKICFPGEIANNCELRHLFSGVNSF	SRTLELISP-NKWGDILD--GVTAS	CRDN-GASSFYRNLMWLVKNKNGK-YPVI	KGDYNNNTTGRDVLVWJG-IHHEPDTTETALNLYASKN

324 333

H1_Av IGDCPKYVKSTKLRMATGLRNVPESIQ---SRGLFCAIAGFIEGGWTCMIDGWYGHQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITSKVNSVIEKMNITQTAVCKEFNFLERRIENLN
H1_Hu1 IGDCPKYVRSTKLRMATGLRNVPESIQ---SRGLFCAIAGFIEGGWTCMIDGWYGHQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITTKVNSVIEKMNITQTAVCKEFNFLERRIENLN
H1_Hu2 IGDCPKYVRSAKLRNVTLGNVPESIQ---SRGLFCAIAGFIEGGWTCMVDGWYGHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNITQTAVCKEFNKLERRMENLN
H2_Av IGDCPKYVKSRLVTLATGLRNVPQIE---SRGLFCAIAGFIEGGWQCMVDGWYHHSNDQSGSYAADKSTQKALDGIITNKVNSVIEKMNITQFEAVCKEFNFLERRIENLN
H2_Hu IGDCPKYVKSEKIVTLATGLRNVPQIE---SRGLFCAIAGFIEGGWQCMIDGWYGHHSNDQSGSYAADKSTQKADGITNKVNSVIEKMNITQFEAVGKFFSNLERRIENLN
H3_Av YGACPKYVKQNTIKLATGMNRNVPK---QTRGLFCAIAGFIEHNGWEGMIDGWYGFRRHQNSEGTGQAAADLKSTQAAIDQIINRKLNRVIEKTNKPHQIEKKEFSEVEGRIQDLE
H3_Hu1 YGACPKYVKQNTIKLATGMNRNVPK---QTRGLFCAIAGFIEHNGWEGMIDGWYGFRRHQNSEGTGQAAADLKSTQAAIDQINGKLNRVIEKTNKPHQIEKKEFSEVEGRIQDLE
H3_Hu2 YGACPRYVKQNTIKLATGMNRNVPK---QTRGLFCAIAGFIEHNGWEGMVDGWYGFRRHQNSEGTGQAAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNKPHQIEKKEFSEVEGRIQDLE
H4_Av IGDCPKYVKQGSILKLATGMNRNVPK---ATRGLFCAIAGFIEHNGWQGLIDGWYGFRRHQNAEGETGFAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNKPHQIEKKEFSEVEGRIQDLE
H5_Av1 IGDCPKYVKSRLVTLATGLRNVPQIEFRRRRKRGLEFCAIAGFIEGGWQCMVDGWYHHSNEQSGSYAADKSTQKALDGVITNKVNSIIDKMNITQFEAVCKEFNFLERRIENLN
H5_Av2 IGDCPKYVKSRLVTLATGLRNVPQIEFRRRRKRGLEFCAIAGFIEGGWQCMVDGWYHHSNEQSGSYAADKSTQKALDGVITNKVNSIIDKMNITQFEAVCKEFNFLERRIENLN
H6_Av IGDCPKYVKSESIRLATGLRNVPQIA---TRGLFCAIAGFIEGGWTELVVDGWYGHHSNQSGSYAADKSTQKALDGIITNKVNSIIDKMNITQFEAVDHEFFSNLERRIDMWN
H7_Av VGKCPRYVKQESIMLATGMKNVPEIP---KGRGLFCAIAGFIEHNGWEGMIDGWYGFRRHQNAQEGEFTAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQFELIDNEFTEVEKQIGNVI
H8_Av MGDCPKYVKASIRLAVGLRNTPSVE---PRGLFCAIAGFIEGGWSEMDGWYGFHHSNEGTGMAADQKSTQEAIDKITNKVNSIIDKMNREFVNVNHEFFSEVEKRRINLN
H9_Av FGTCPKYVRVKSILAVGLRNVPARS---NRGLFCAIAGFIEGGWPELVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRDSTQRAIDKITSKVNSIIDKMNITQFEAVDHEFFSEVEFTRLNMTN
H10_Av VGQCPKYVNNKKSILLATGMNRNVPVY---QGRGLFCAIAGFIEHNGWEGMVDGWYGFRRHQNAQGTGQAAADYKSTQAAIDQITGKLNRLIEKTNTEFESIESEFSEIEHQIGNVI
H11_Av IGDCPKYVNVKSILKLATGLRNVPATA---TRGLFCAIAGFIEGGWPEGLINGWYGFQHRNEEGTGAADKSTQKALDQITSKVNSIIDKMNITVDRMNTNPFESVQHEFSEIEERINQLS
H12_Av IGKCPKYTPSGSILKLAIGLRNVPEVQ---NRGLFCAIAGFIEGGWPELVAGWYGFQHRNAEGETGMAADRDSTQKALDNNMKNLNNVIDKMNKQFEVVNVNHEFFSEVEFSRINMTN
H13_Av IGDCPKYIKSGQILKLATGLRNVPATS---NRGLIICALAGFIEGGWPEGLINGWYGFQHRNEQGTGFAADKSTQKALDQITTKINNIIIDKMNNGNYDSIRGEBFNQVEKRRINMLA
H14_Av IGNCPKYVKQGSIMLATGMNRNVPK---QAKGLFCAIAGFIEHNGWQGLIDGWYGFRRHQNAEGETGFAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNKPHQIEKKEFSEVEGRIQDLE
H15_Av VGRCPRYVKQSSIPALGMKNVPEKI---HTRGLFCAIAGFIEHNGWEGMIDGWYGFRRHQNAQGSQGTGFAADYKSTQAAIDQITGKLNRLIEKTNITQFELIDNEFTEVEQIGNVI
H16_Av IGDCPKYIKSGQILKLATGLRNVPVSG---BRGLFCAIAGFIEGGWPEGLINGWYGFQHRNEQGTGFAADKSTQKALDEITTKINNIIIDKMNNGNYDSIRGEBFNQVEKRRINMLA

FIG. 3B

FIG. 4A

CA_04_09 MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDIVDVLKKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECELSLSTASSWSYI
 CA_04_09_Mut1 MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDIVDVLKKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECELSLSTASSWSYI
 CA_04_09_Mut2 MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDIVDVLKKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECELSLSTASSWSYI
 SC_1_18 MEARLLVLLCAFAATNADTLCIGYHANNSTDIVDVLKKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECDLLLTASSWSYI
 SolIs_3_06 MKVLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDIVDVLKKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECELLISRESWSYI
 Bris_59_07 MKVLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDIVDVLKKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECELLISKESWSYI
 CA_04_09 VETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI FPKTSSWPNHDSNKGVT AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYFKLSKSYINDKGKEVLV
 CA_04_09_Mut1 VETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI FPKTSSWPNHDSNKGVT AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYFKLSKSYINDKGKEVLV
 CA_04_09_Mut2 VETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI FPKTSSWPNHDSNKGVT AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYFKLSKSYINDKGKEVLV
 SC_1_18 VETSNSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFEKFEI FPKTSSWPNHETTKGVT AACSYAGASSFYRNLLWLVKKGSSYFKLSKSYVNNKGKEVLV
 SolIs_3_06 VEKPNPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEI FPKESSWPNHETT - GVSASCSHNGESSFYKNLIWLVCKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLV
 Bris_59_07 VEKPNPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEI FPKESSWPNHETT - GVSASCSHNGESSFYRNLIWLVCKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLV
 CA_04_09 LWGIHHPSTADQSSLYQNADTYVFGSSRYSKFKFPEIAIRPKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP
 CA_04_09_Mut1 LWGIHHPSTADQSSLYQNADTYVFGSSRYSKFKFPEIAIRPKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP
 CA_04_09_Mut2 LWGIHHPSTADQSSLYQNADTYVFGSSRYSKFKFPEIAIRPKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP
 SC_1_18 LWGVHHPPTGTDQSSLYQNADAYVSVGSSKYNRRFTPEIAARPKVRDQEGRMNYWTLLEPGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGGIITSDAP
 SolIs_3_06 LWGVHHPNIGDQKALYHKENAYVSVSSHYSRKFTEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAP
 Bris_59_07 LWGVHHPNIGDQKALYHTENAYVSVSSHYSRKFTEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAP
 183 186 190 196 219 222 227
 136 145 153 156

FIG. 4A (continuación)

CA_04_09 VHDCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVVKSTKRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGYAADLKS
 CA_04_09_Mut1 VHDCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVVKSTKRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGYAADLKS
 CA_04_09_Mut2 VHDCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVVKSTKRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGYAADLKS
 SC_1_18 VHDCNTKCQTPHGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGGYAADQKS
 SoIIs_3_06 MDECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGYAADQKS
 Bris_59_07 MDKCDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGYAADQKS

 CA_04_09 TQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNFHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIENG
 CA_04_09_Mut1 TQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNFHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIENG
 CA_04_09_Mut2 TQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNFHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIENG
 SC_1_18 TQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNFLERRRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVRNLYEKVKSQLKNNAKEIENG
 SoIIs_3_06 TQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNFLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIENG
 Bris_59_07 TQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNFLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIENG

 CA_04_09 CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGALSFWMCSNGSLQCRICI
 CA_04_09_Mut1 CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGALSFWMCSNGSLQCRICI
 CA_04_09_Mut2 CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGALSFWMCSNGSLQCRICI
 SC_1_18 CFEFYHKCDACMESVNRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVVSLGALSFWMCSNGSLQCRICI
 SoIIs_3_06 CFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVVSLGALSFWMCSNGSLQCRICI
 Bris_59_07 CFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVVSLGALSFWMCSNGSLQCRICI

FIG. 4C

SC 1_18 MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDSHNGKLCCKLGIAPLQIGKCNIAAGWLLGNPECDLLLTASSWSYIVEFSNSENGICYPGD
 SwIA_15_30 MKAILLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDSHNGKLCRIKGIAPLQIGKCNIAAGXKIGNPECDLLLTVSSWSYIVEFSNSDNGICYPGD
 Cal_04_09 MKAILLVLLYTFATANADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDKHNGKLCCKLRGAPLHIGKCNIAAGWLLGNPECESLSTASWSYIVEFSSDNGICYPGD

 SC 1_18 FIDYEELEQLSSVSSFEKFEIIPKTSWPNHETTKGVTACSYAGASSFYRNLLWLLKGGSPKLSKSYVNNKGEVVLWGVHHPPTGTDQDEHYDNADAYVSVGSSK
 SwIA_15_30 FIDYEELEQLSSVSSFEKFEIIPKTSWPNHETTRGVTACPYAGASSFYRNLLWLLKKNENSYPKLSKSYVNNKGEVVLWGVHHPPTSTDDQSEYQNADAYVSVGSSK
 Cal_04_09 FIDYEELEQLSSVSSFERFEIIPKTSWPNHDSMKGVTACPHAGAKGFYKNLLWLLKKNENSYPKLSKSYINDKAGEVVLWGVHHPPTSTADQSEYQNADTYVTVGSSR

 SC 1_18 YNRRFTPEIARPYRQAGRMNYWTLLEPGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGGIITSDAPVHDCNTKCTPHGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRS TKLRMAT
 SwIA_15_30 YDRRFTPEIARPYRQAGRMNYWTLLEPGDTITFEATGNLIVAPRYAFALNRGSEGIITSDAPVHDCDTKCTPHGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRS TKLRMWT
 Cal_04_09 YSKKFKPEIARPYRQAGRMNYWTLVPEPGDKITFEATGNLIVPRYAFAMERNAGSGGIITSDTPVHDCNTTCTPKGAINTSLPFQNIHPVTIGECPKYVRS TKLRLAT

 SC 1_18 GLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGHQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNLEERRIENLNKKVDDGFLDIWITYNAELLY
 SwIA_15_30 GLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGLIDGWYGHQNGQSGSYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTOFTVVGKEFNLEERRIKNLNKKVDDGFLDVWITYNAEMIV
 Cal_04_09 GLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGHQNEQSGSYAADLKSQNAIDGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWITYNAELLY

 SC 1_18 LLENERTLDFHDSNVNLYEKVRSQLNNAKEIINGGCFEYHKODDACEVSRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVSLGAI SFMMC
 SwIA_15_30 LLENERTLDFHDSNVNLYEKARSQLRNNAKEIINGGCFEYHKODDACEVSRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMVYQILAIYSTVASSLVLVSLGAI SFMMC
 Cal_04_09 LLENERTLDYHDSNVNLYEKVRSQLNNAKEIINGGCFEYHKODNTCEVSVKNGTYDYPKYSEAKLNREEIDGVKLESTRYIYQILAIYSTVASSLVLVSLGAI SFMMC

 SC 1_18 SNGSIQCRICI 566
 SwIA_15_30 SNGSIQCRICI 566
 Cal_04_09 SNGSIQCRICI 566

 SC 1_18 SNGSIQCRICI 136 145 153 156 183 190 196
 SwIA_15_30 SNGSIQCRICI 136 145 153 156 183 190 196
 Cal_04_09 SNGSIQCRICI 136 145 153 156 183 190 196

 SC 1_18 SNGSIQCRICI 219 225
 SwIA_15_30 SNGSIQCRICI 219 225
 Cal_04_09 SNGSIQCRICI 219 225

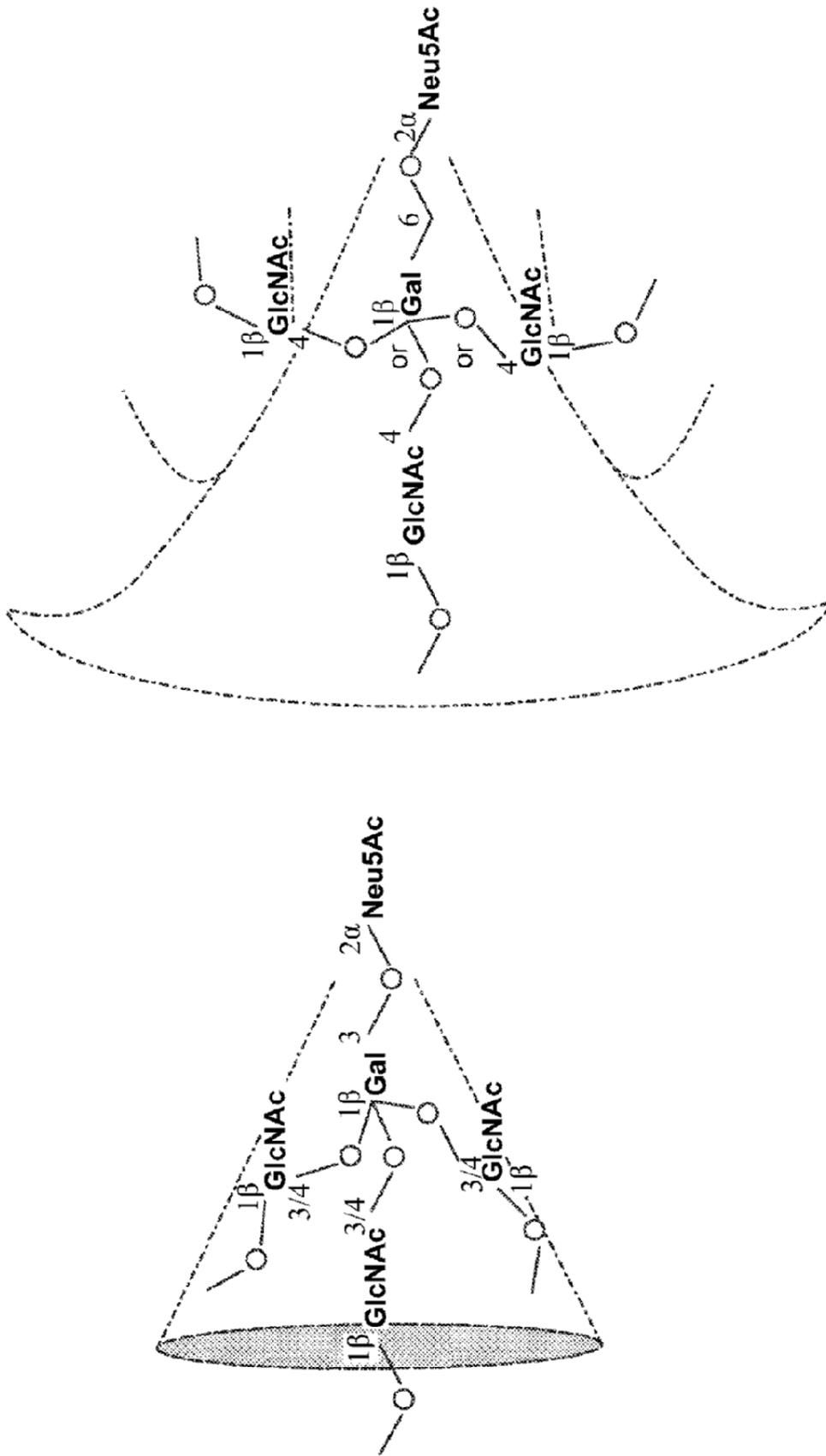
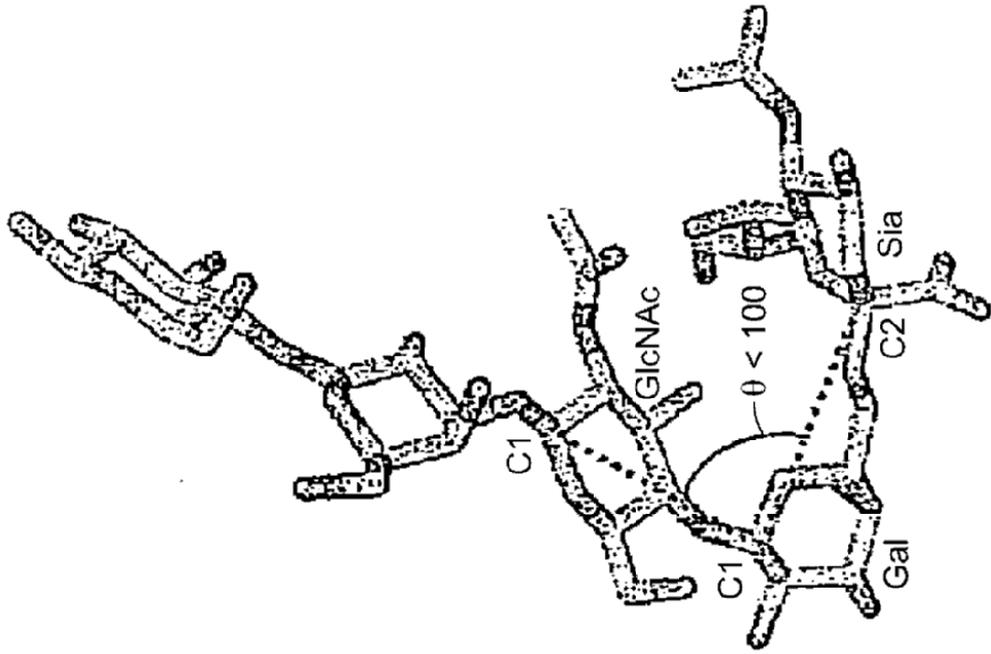


FIG. 5A

Topología de tipo sombrilla



Topología de tipo cono

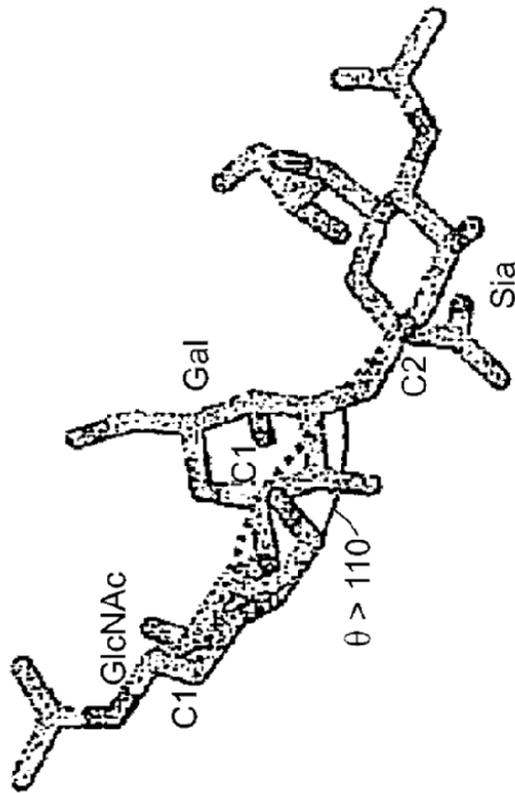
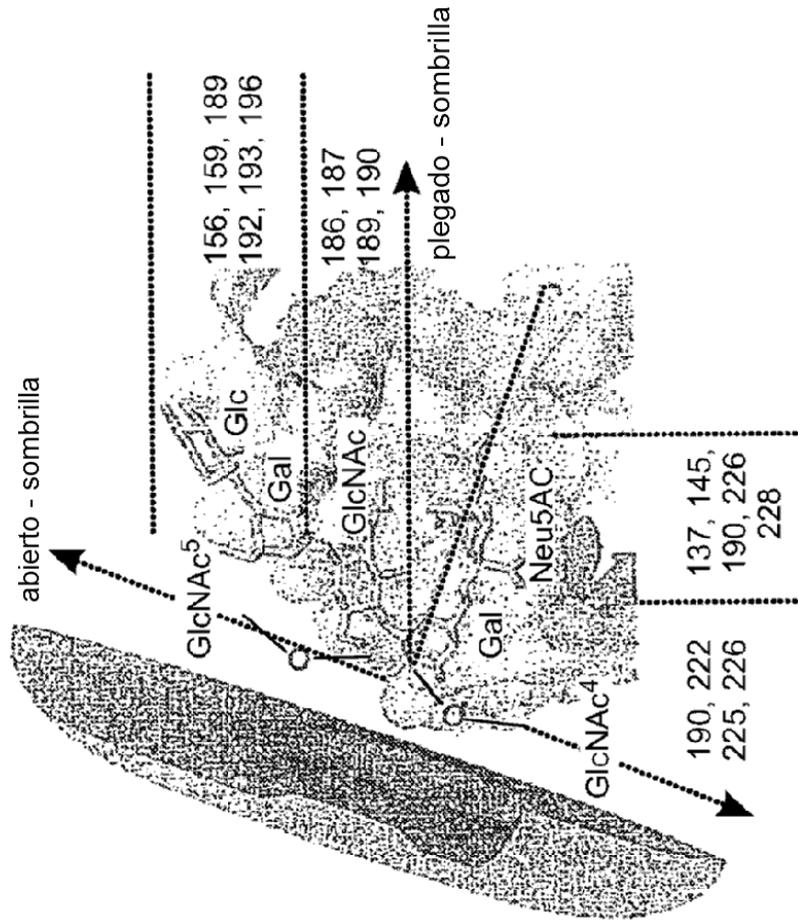


FIG. 5B-1

Interacciones de HA con topología de tipo sombrilla



Interacciones de HA con topología de tipo cono

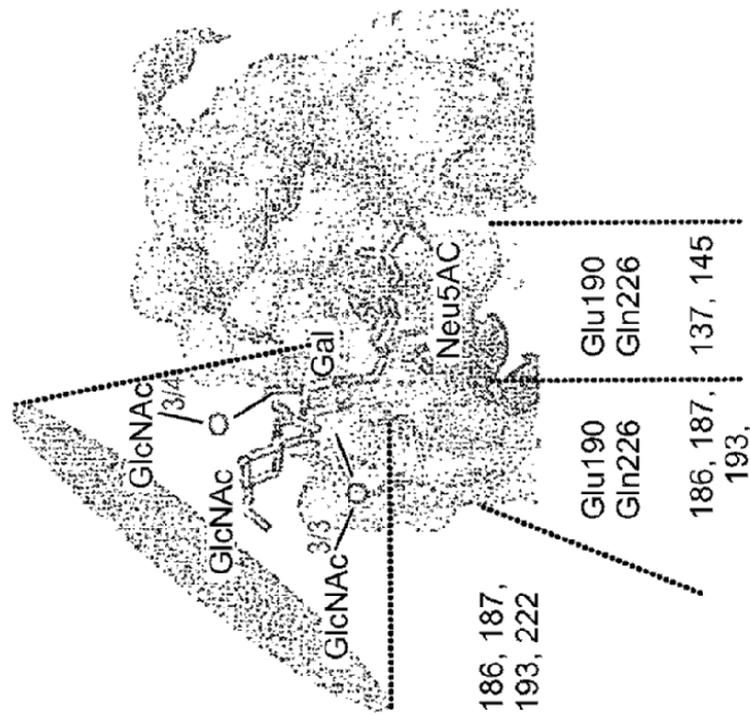


FIG. 5B-2

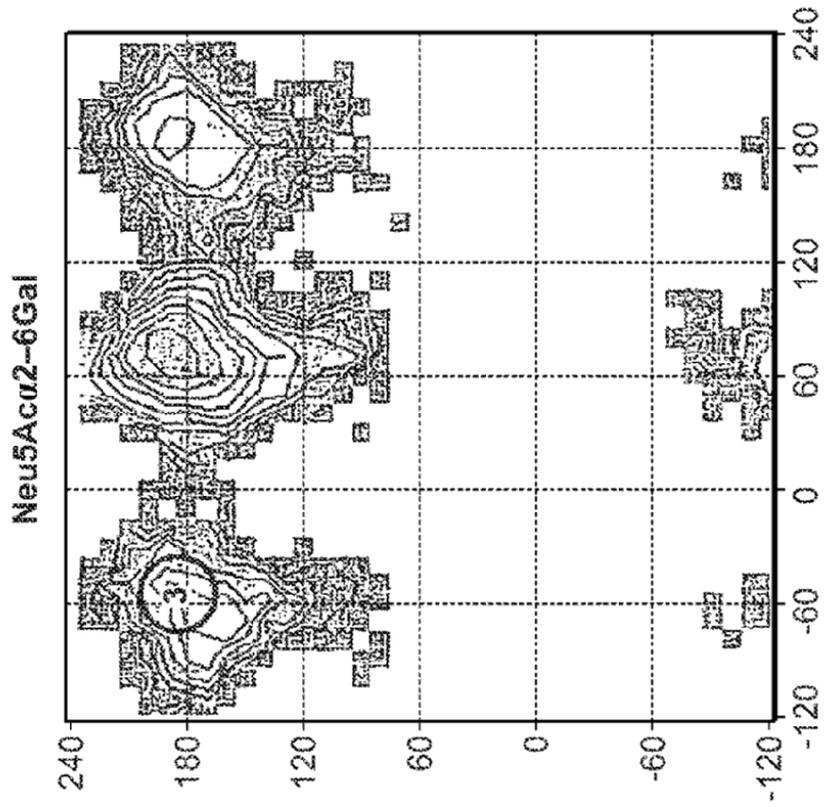


FIG. 5C-2

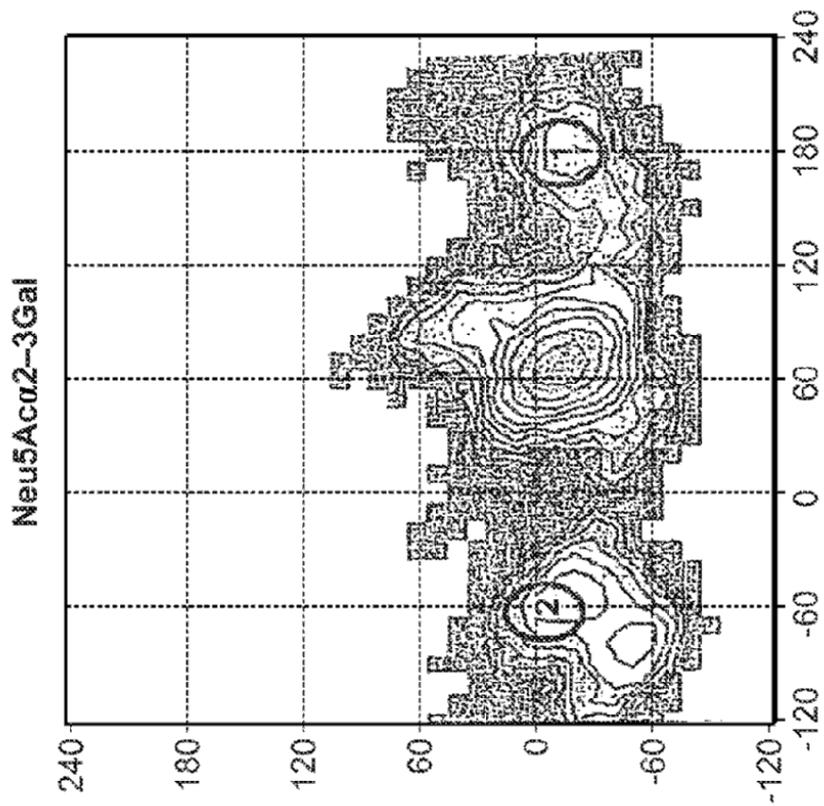


FIG. 5C-1

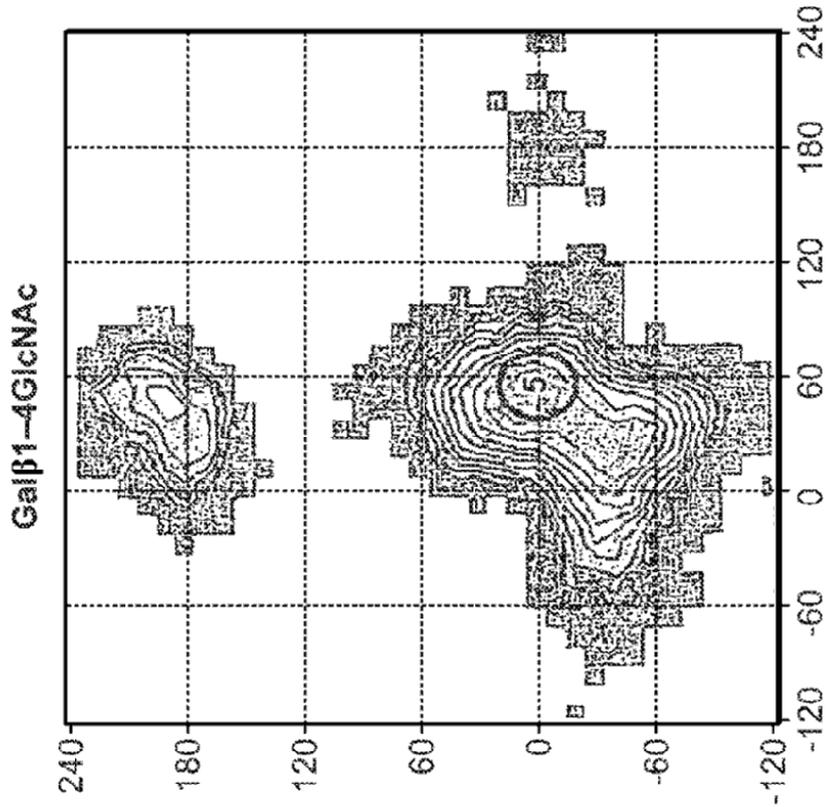


FIG. 5C-4

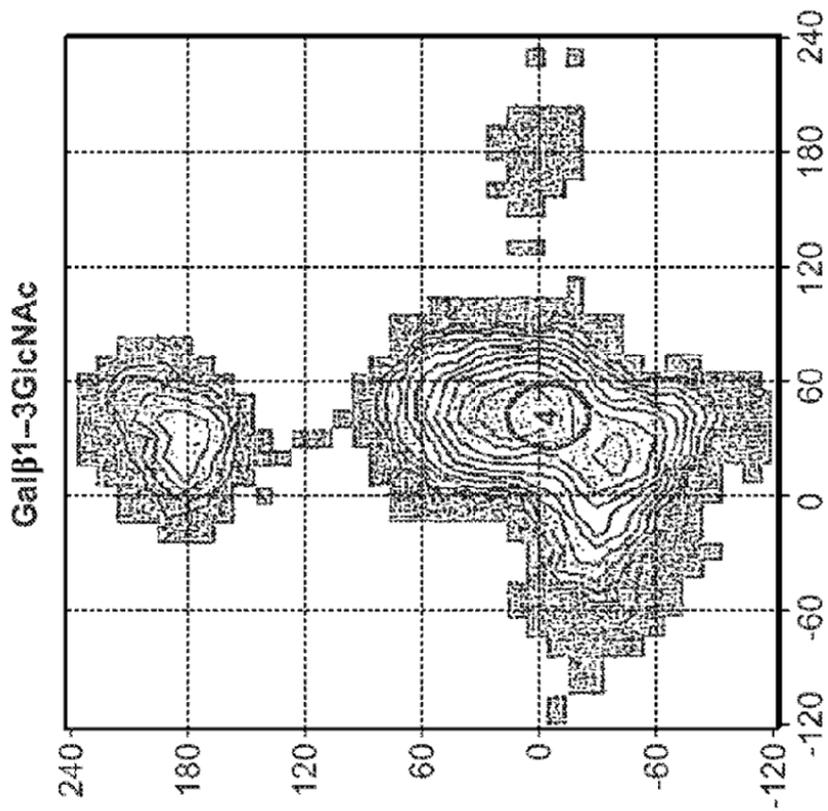


FIG. 5C-3

Muestreo conformacional de enlace α 2-3

Tipo cono	100%
Tipo sombrilla	0%

Muestreo conformacional de enlace α 2-6

	Tipo sombrilla (%)	Tipo cono (%)
$\omega = - 60^\circ$	60	20
$\omega = + 60^\circ$	10	40
$\omega = 180^\circ$	30	30

FIG. 5C-5

FIG. 5C-6

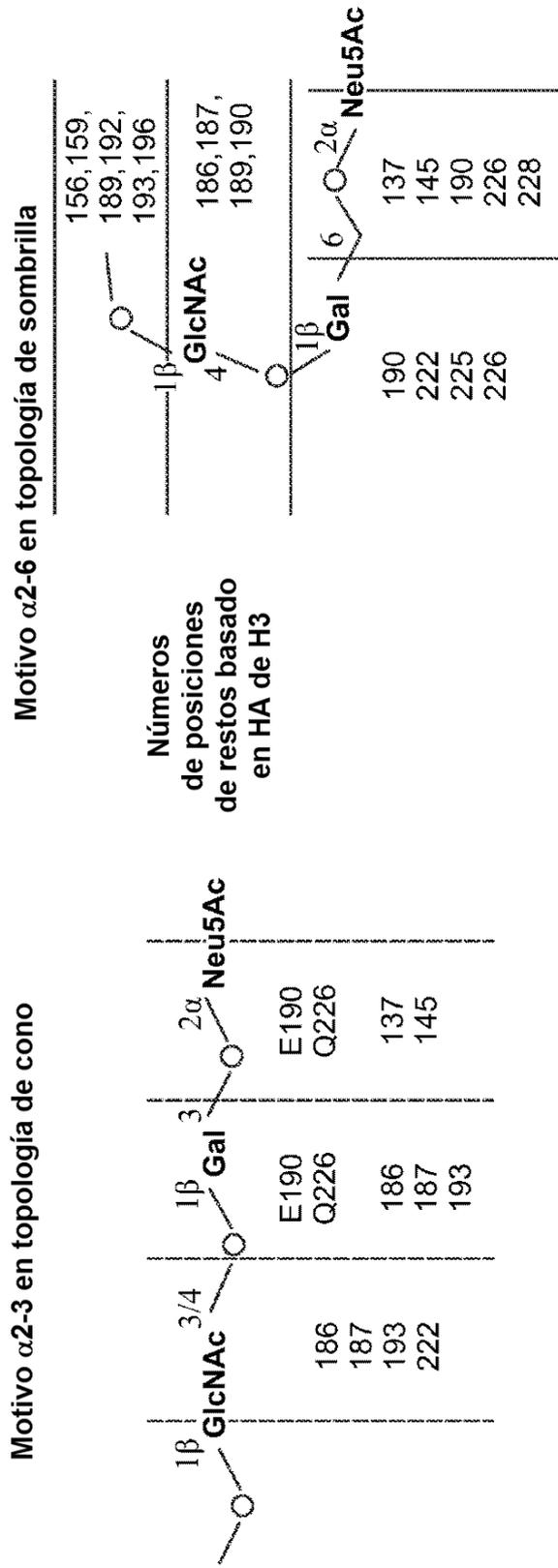
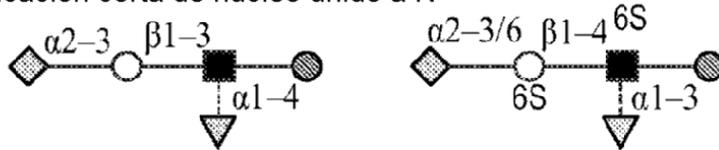


FIG. 6

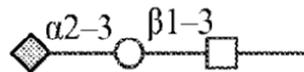
Motivo $\alpha 2-3$ y $\alpha 2-6$ en topología de cono

- Típico de oligosacárido corto o ramificación de oligosacárido unido con una Estructura de Núcleo

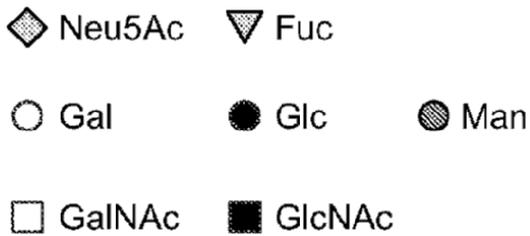
- Ramificación corta de núcleo unido a N



- Ramificación corta de núcleo unido a O



- La topología de cono también puede adoptarse por ramificaciones de oligosacáridos $\alpha 2-3$ y $\alpha 2-6$ más largas unidas a Estructura de Núcleo



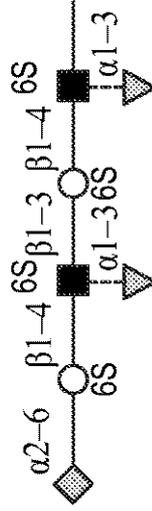
Las líneas grises discontinuas, 4S y 6S indican sitios potenciales para fucosilación y modificaciones de sulfatación

FIG. 7

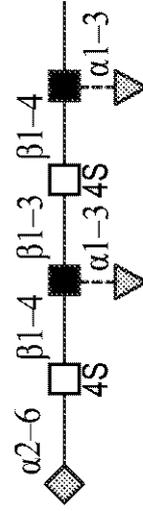
Clave: ■ GlcNAc □ GalNAc ○ Gal ● Glc ◆ Neu5Ac ▼ Fucosa □ HexNAc Terminal

Señuelos de glicano de topología de tipo sombrilla α 2-6 largos

Glicanos unidos a N:



Ramificación de extensión de tipo 2 α 2-6 unida a núcleo de trimanosilo



Ramificación de extensión de LacDiNAc α 2-6 unida a núcleo de trimanosilo

FIG. 8A-1

Glicanos de topología de *tipo sombrilla* $\alpha 2-6$ largos que no son señuelos

Glicanos unidos a N:

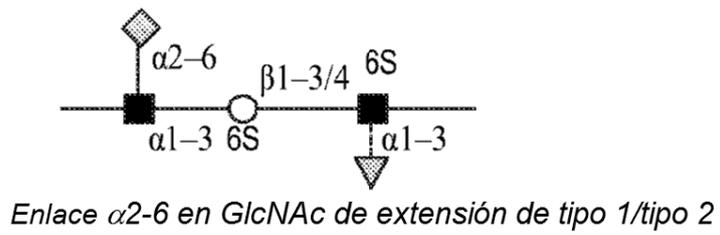
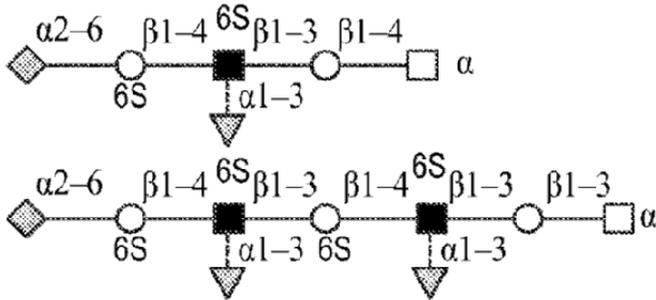


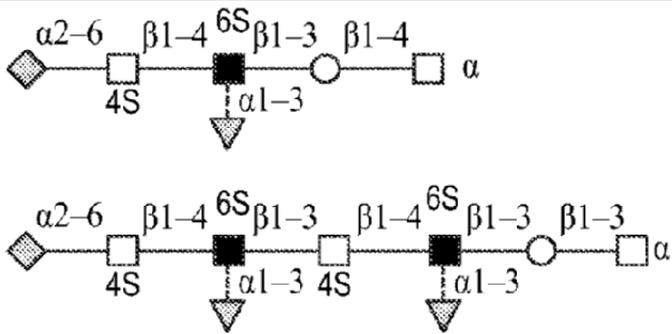
FIG. 8A-2

Señuelos de glicano de topología de *tipo sombrilla* α 2-6 largos

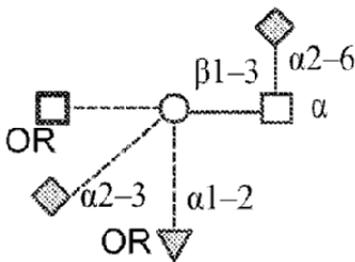
Glicanos unidos a O:



Ramificación de extensión de tipo 2 α 2-6 en una estructura de tipo Núcleo 1



Ramificación de extensión de LacDiNAc α 2-6 en una estructura de tipo Núcleo 1



α 2-6 unido a GalNAc de núcleo en estructura de tipo Núcleo 1

FIG. 8A-3

Señuelos de glicano de topología de *tipo sombrilla* α 2-6 largos

Glicanos unidos a O:

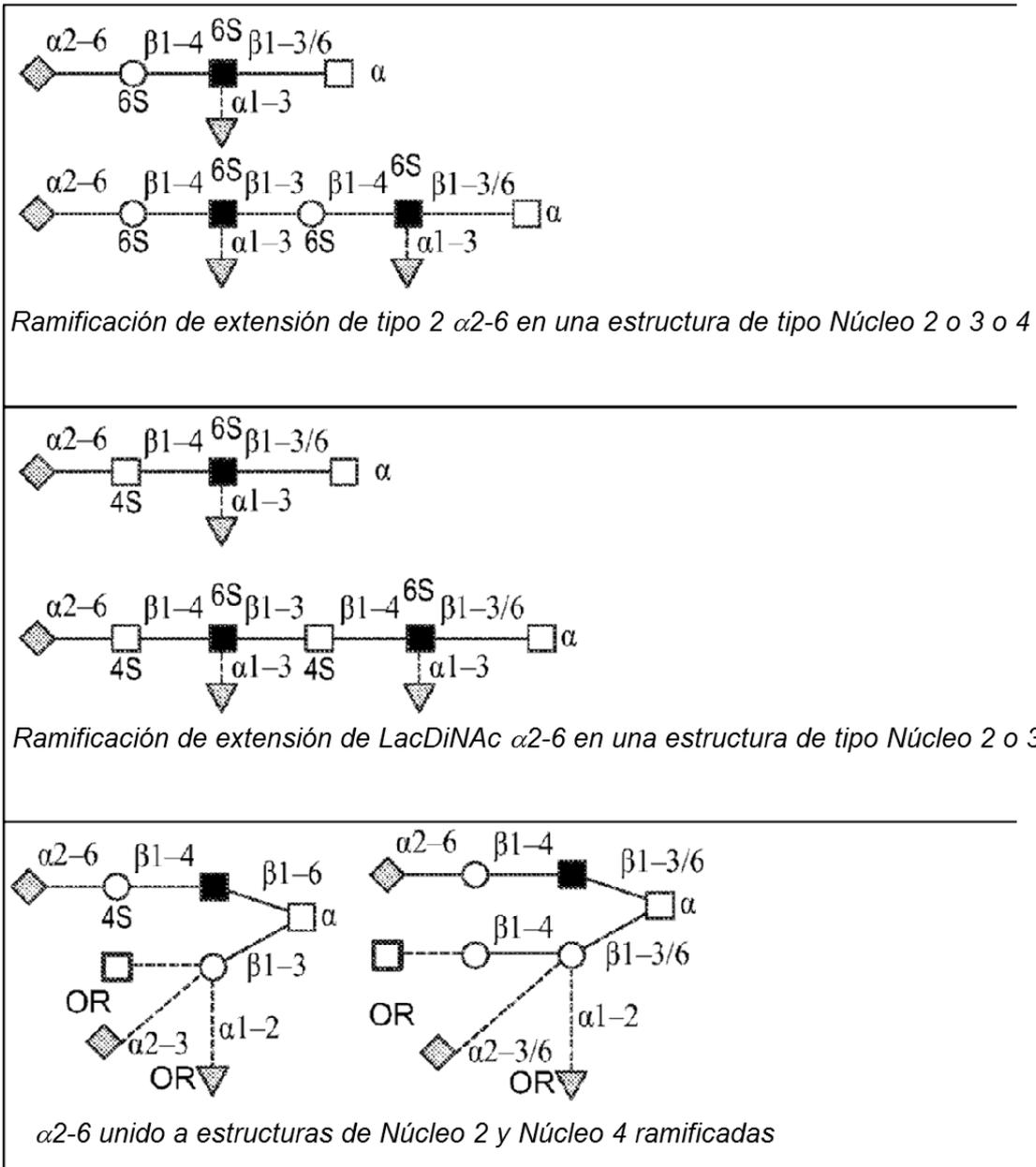


FIG. 8A-4

Glicanos de topología de *tipo sombrilla* $\alpha 2-6$ largos que no son señuelos

Glicanos unidos a O:

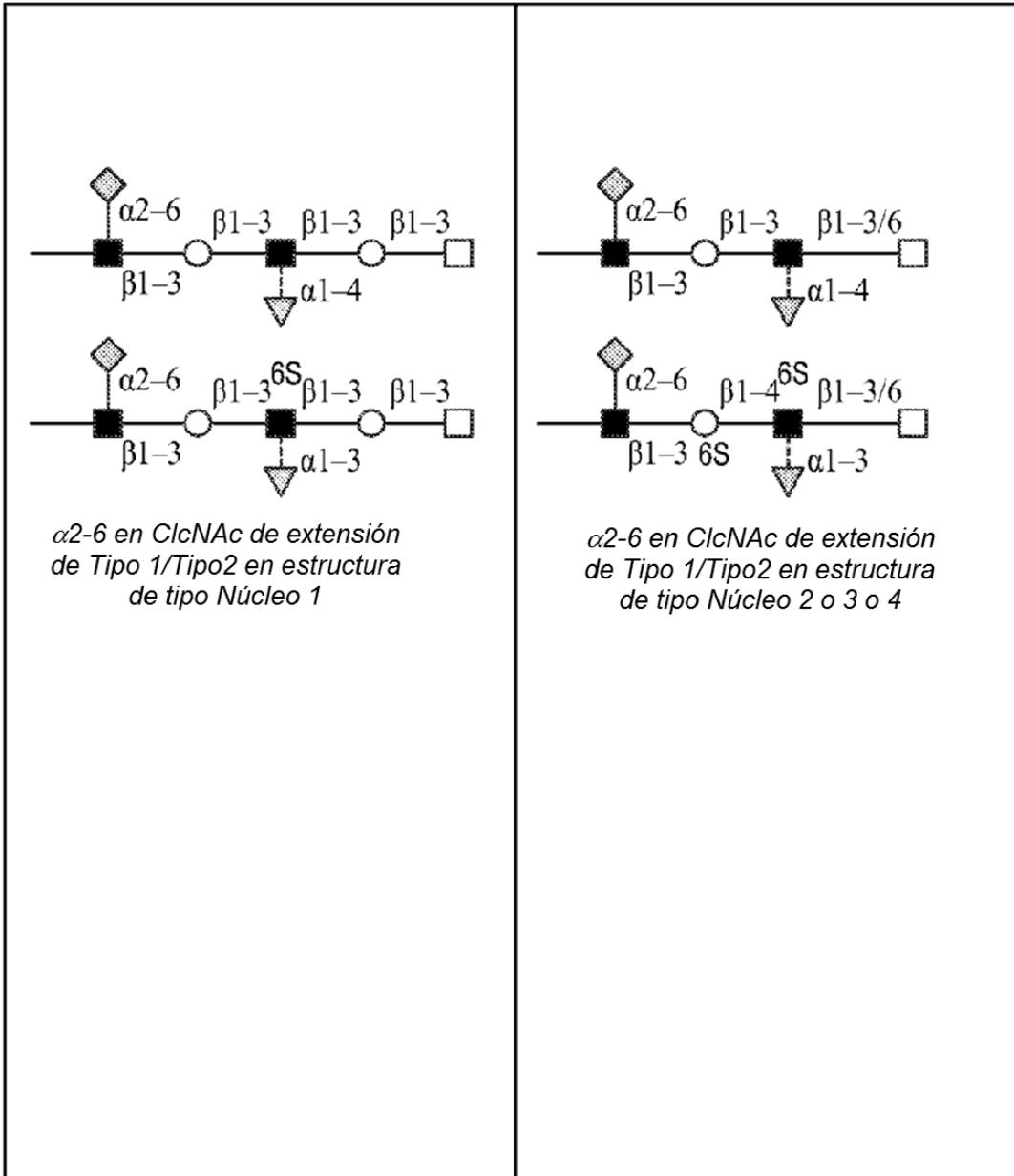


FIG. 8A-5

Señuelos de glicano de topología de tipo sombrilla α 2-6 largos

Glicolípidos:

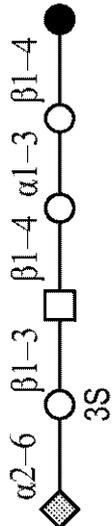
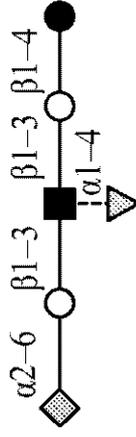
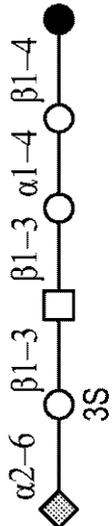
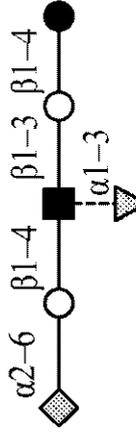
 <p>α2-6 β1-3 β1-4 α1-3 β1-4</p> <p>Núcleo de glucosilceramida tipo Isogloblo</p>	 <p>α2-6 β1-3 β1-3 β1-4</p> <p>Núcleo de glucosilceramida tipo Lacto</p>
 <p>α2-6 β1-3 β1-3 α1-4 β1-4</p> <p>Núcleo de glucosilceramida tipo Globo</p>	 <p>α2-6 β1-4 β1-3 β1-4</p> <p>Núcleo de glucosilceramida tipo Neolacto</p>

FIG. 8A-6

Glicanos de topología de *tipo sombrilla* α 2-6 largos que no son señuelos

Glicolípidos:

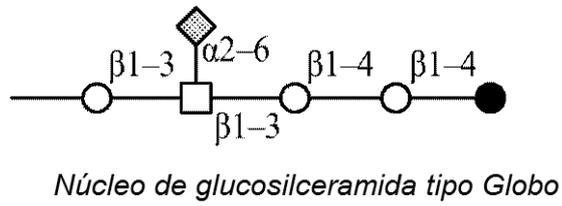
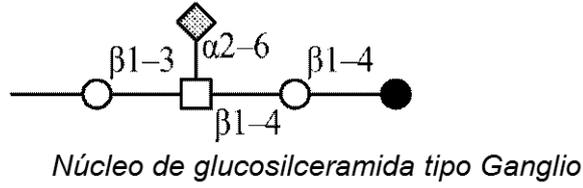


FIG. 8A-7

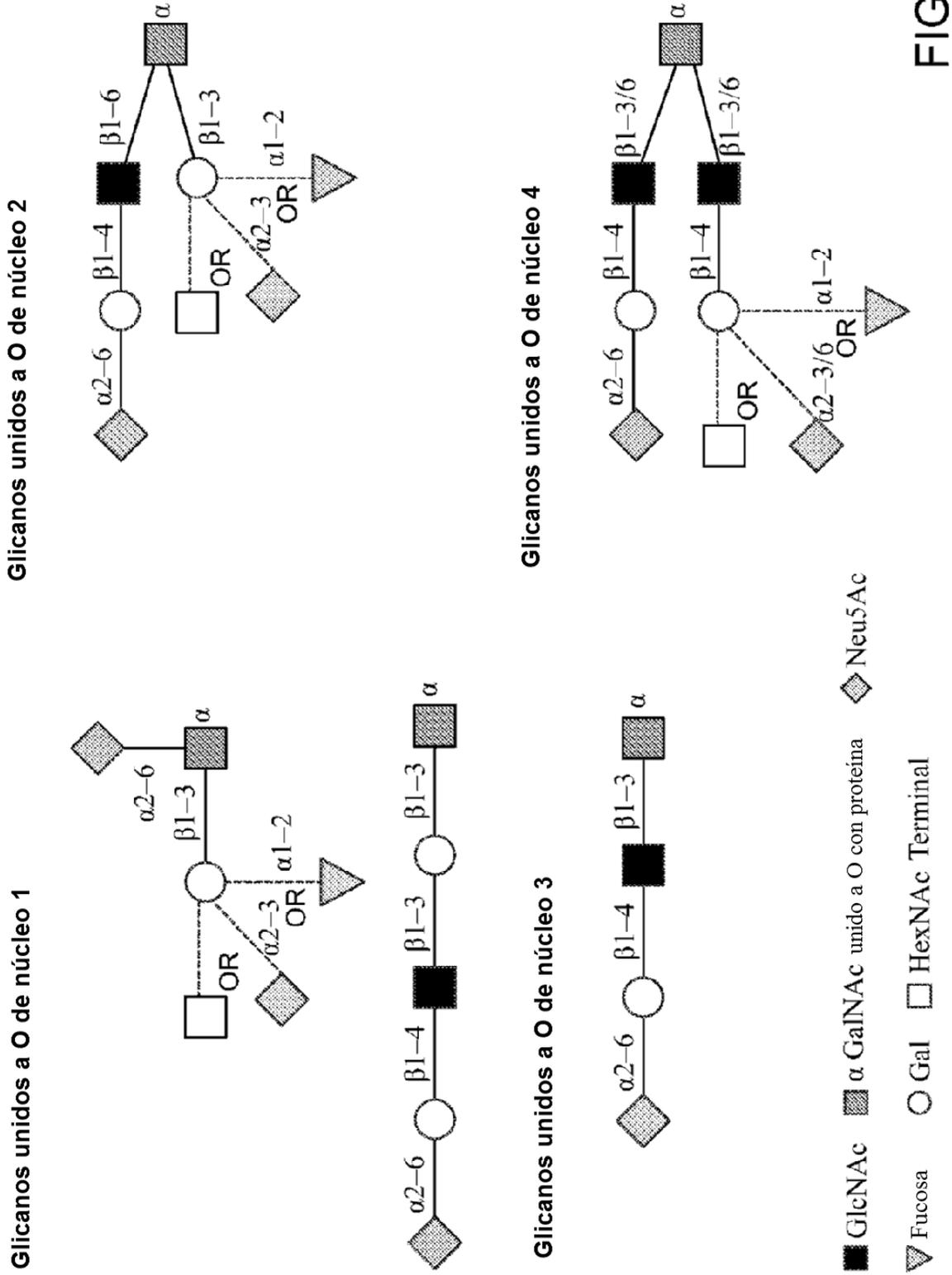


FIG. 8B

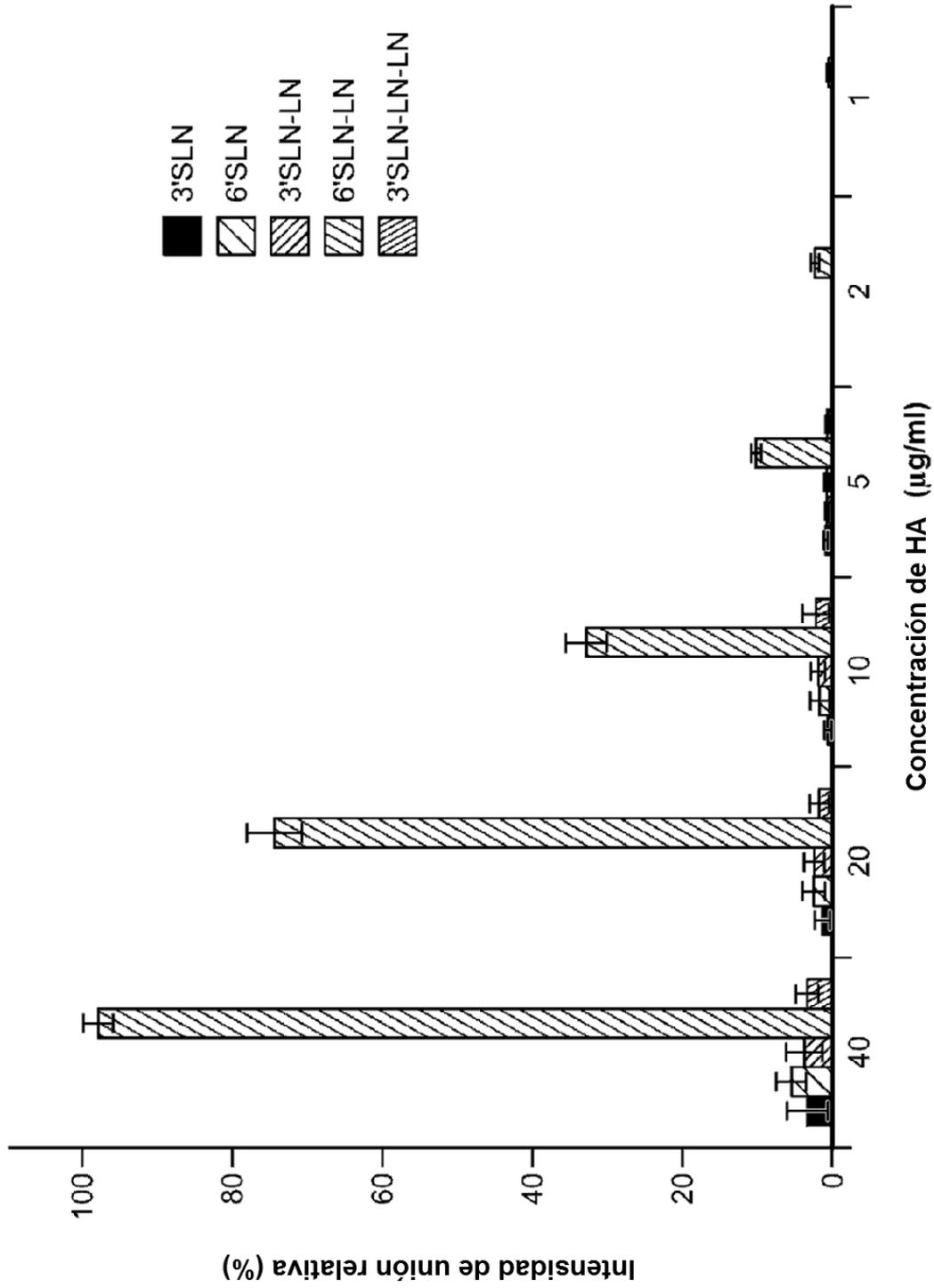


FIG. 9A

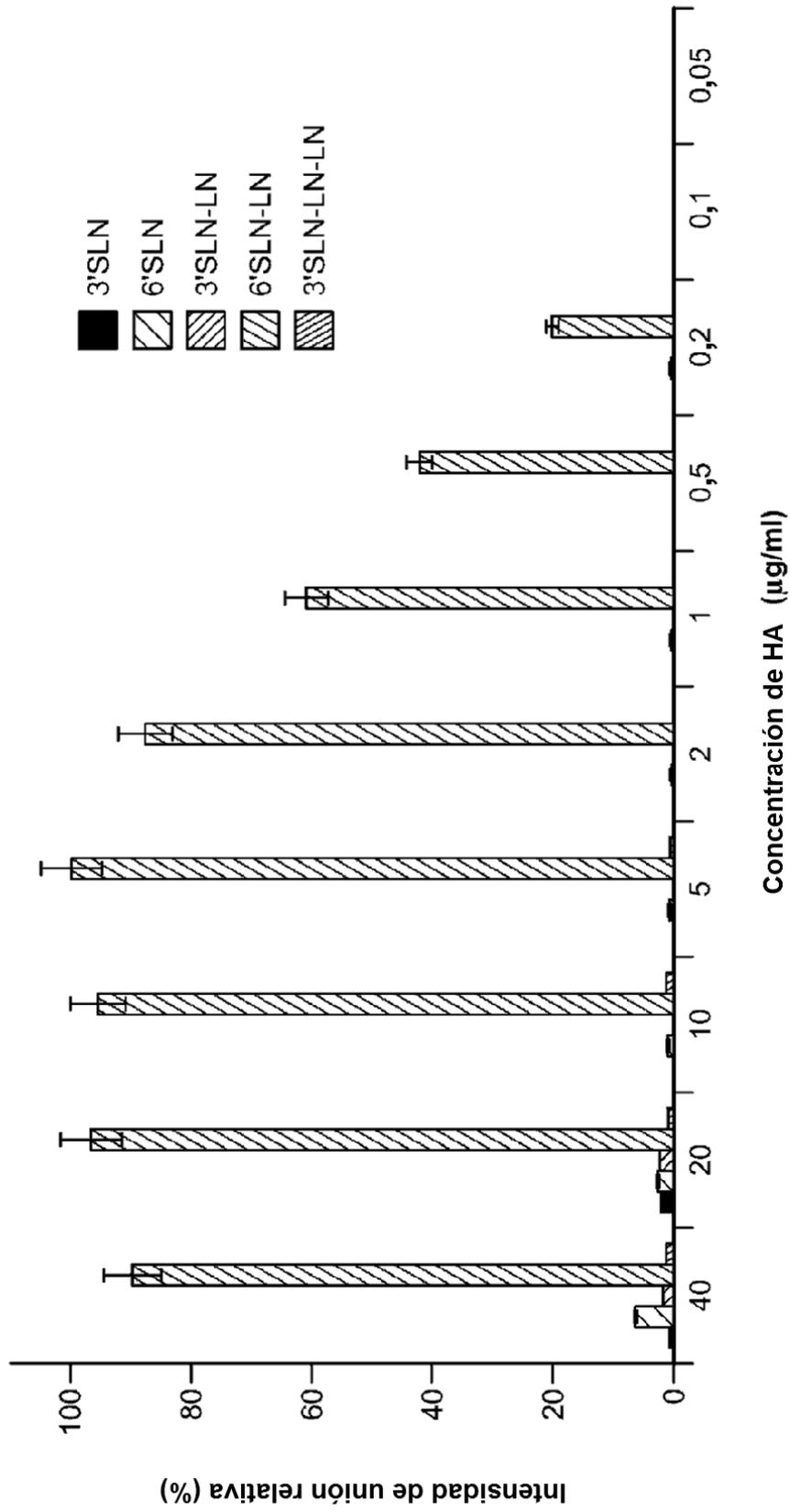


FIG. 9B

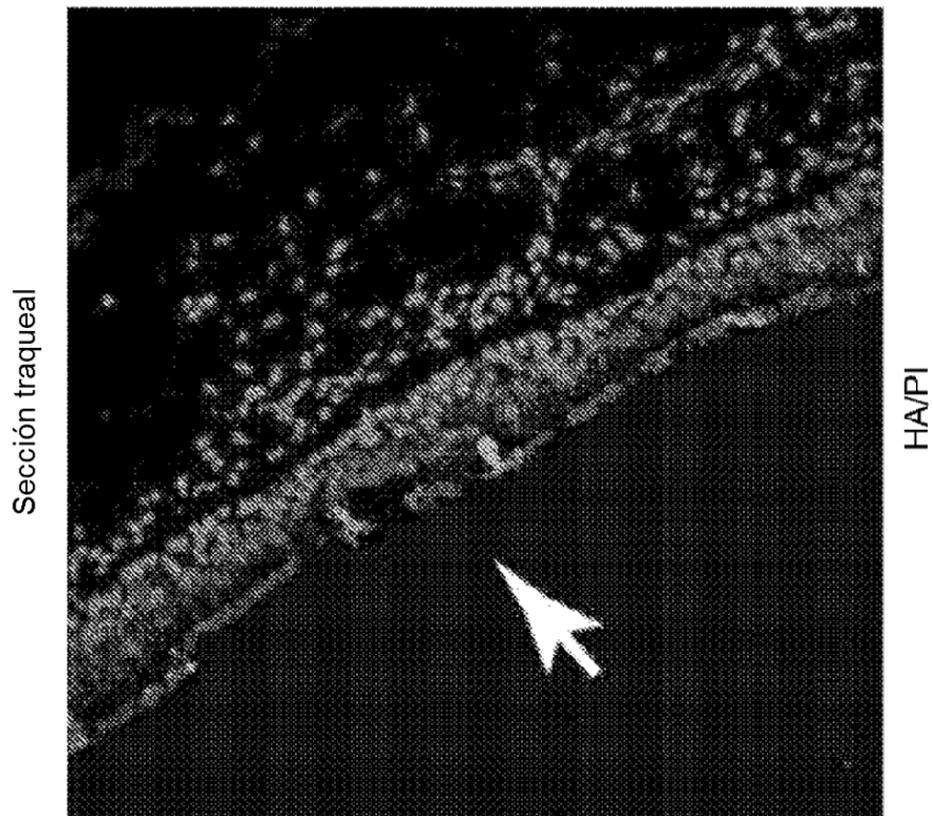
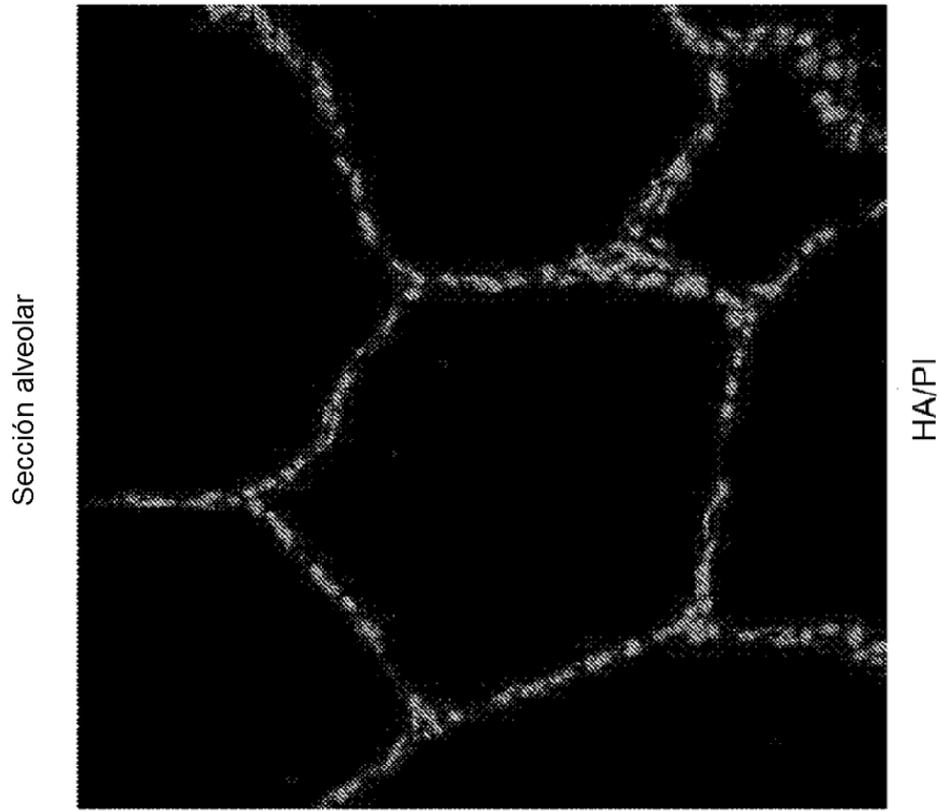


FIG. 10

	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3				Grupo 4				Grupo 5						
	136	138	226	137	153	155	194	183	145	222	225	190	189	187	186	219	227	192	193	156	159	196	
Cepas H1N1	S	S	Q	A	W	T	L	H	S	K	D	D	G	N	P	K	E	R	A	G	G	H	
Solls_3_06	S	S	Q	A	W	T	L	H	S	K	D	D	G	N	P	K	E	R	A	G	G	H	
Bris_59_07	S	S	Q	A	W	T	L	H	S	K	D	D	G	N	P	K	E	R	A	G	G	H	
NewCal_20_99	T	S	Q	T	W	T	I	H	S	K	D	D	R	N	S	K	E	R	A	G	G	H	
TX_36_91	T	A	Q	A	W	T	L	H	S	K	D	D	T	T	P	A	A	Q	S	K	S	Q	
SC18	T	A	Q	A	W	V	L	H	K	K	D	D	A	T	S	I	E	Q	S	K	N	Q	
TX/15	T	A	Q	A	W	V	L	H	K	K	D	D	A	T	S	I	E	Q	S	K	N	Q	
MX/4482	T	A	Q	A	W	V	L	H	K	K	D	D	A	T	S	I	E	Q	S	K	N	Q	
CA/04	T	A	Q	A	W	V	L	H	K	K	D	D	A	T	S	I	E	Q	S	K	N	Q	
	Neu5Ac-1								Gal-2				GlcNAc-3				Gal-4, Glc-5,...						

FIG. 11

Desestabilización de ASP190
debido a combinación
Ile219/Glu227

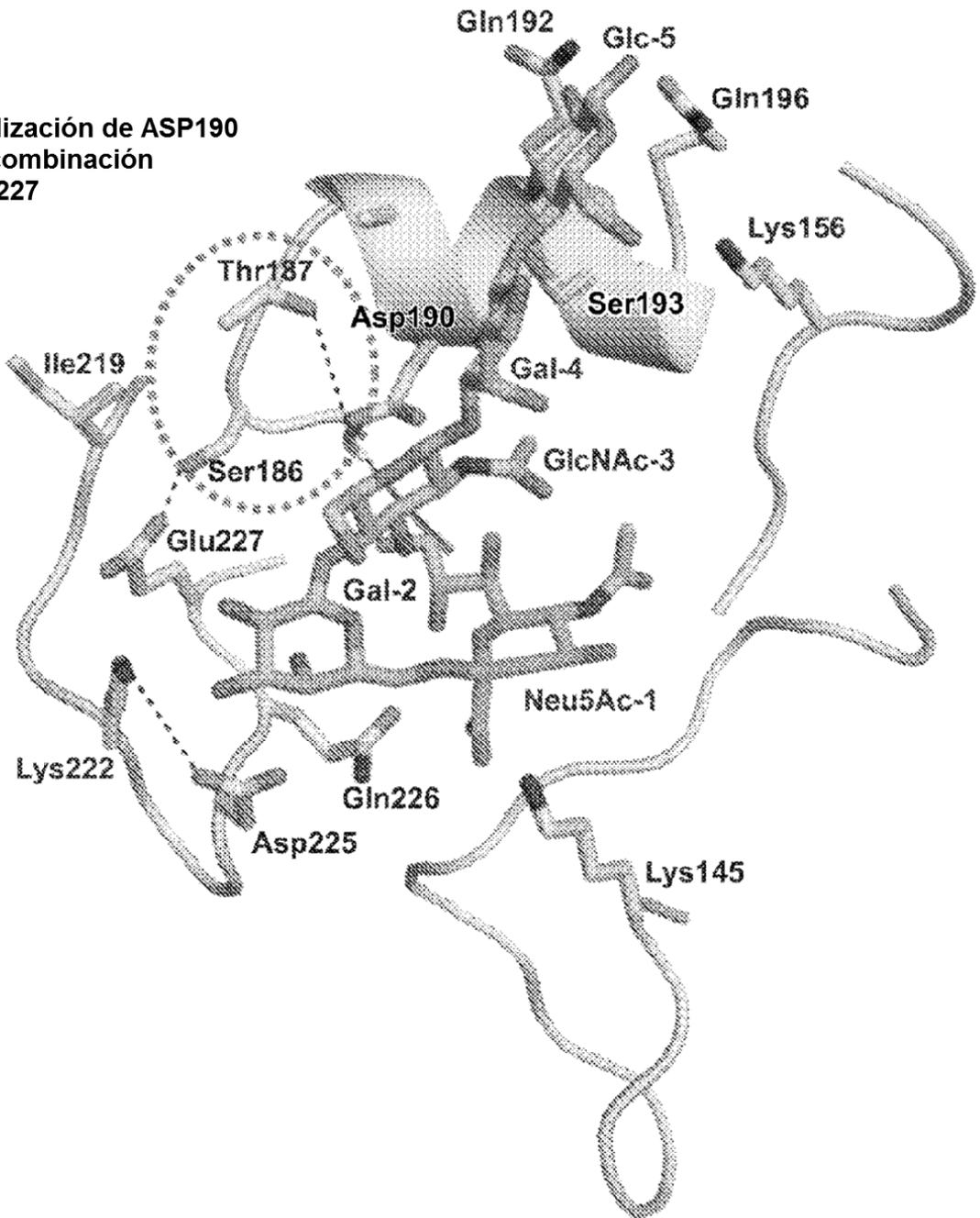


FIG. 12

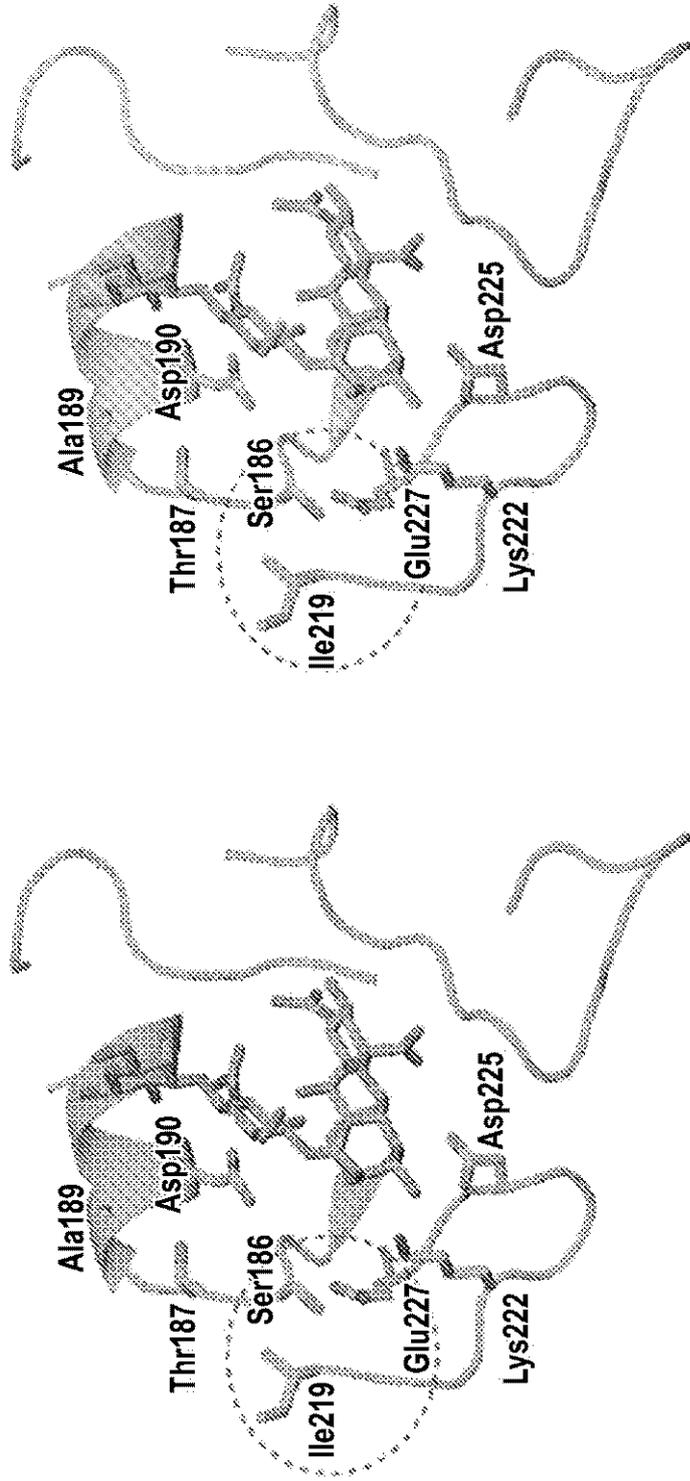


FIG. 13A

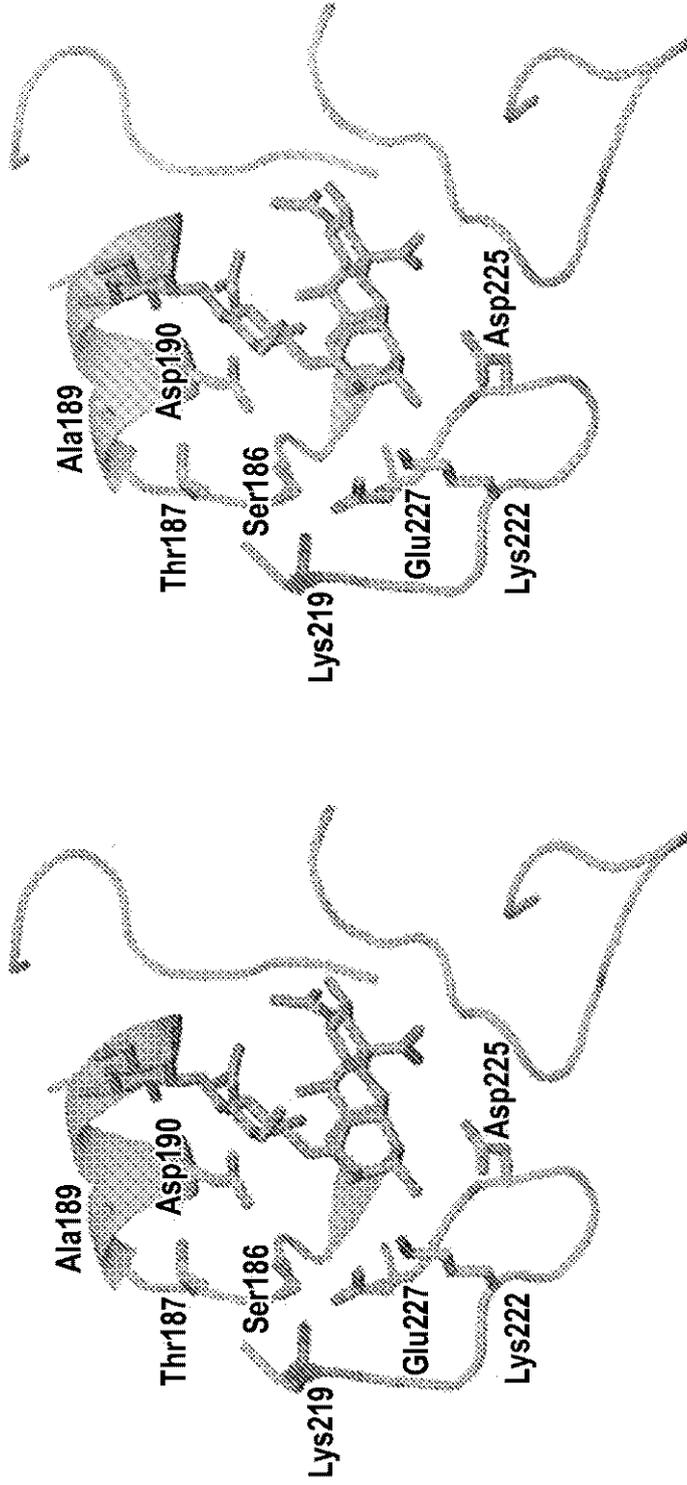


FIG. 13B

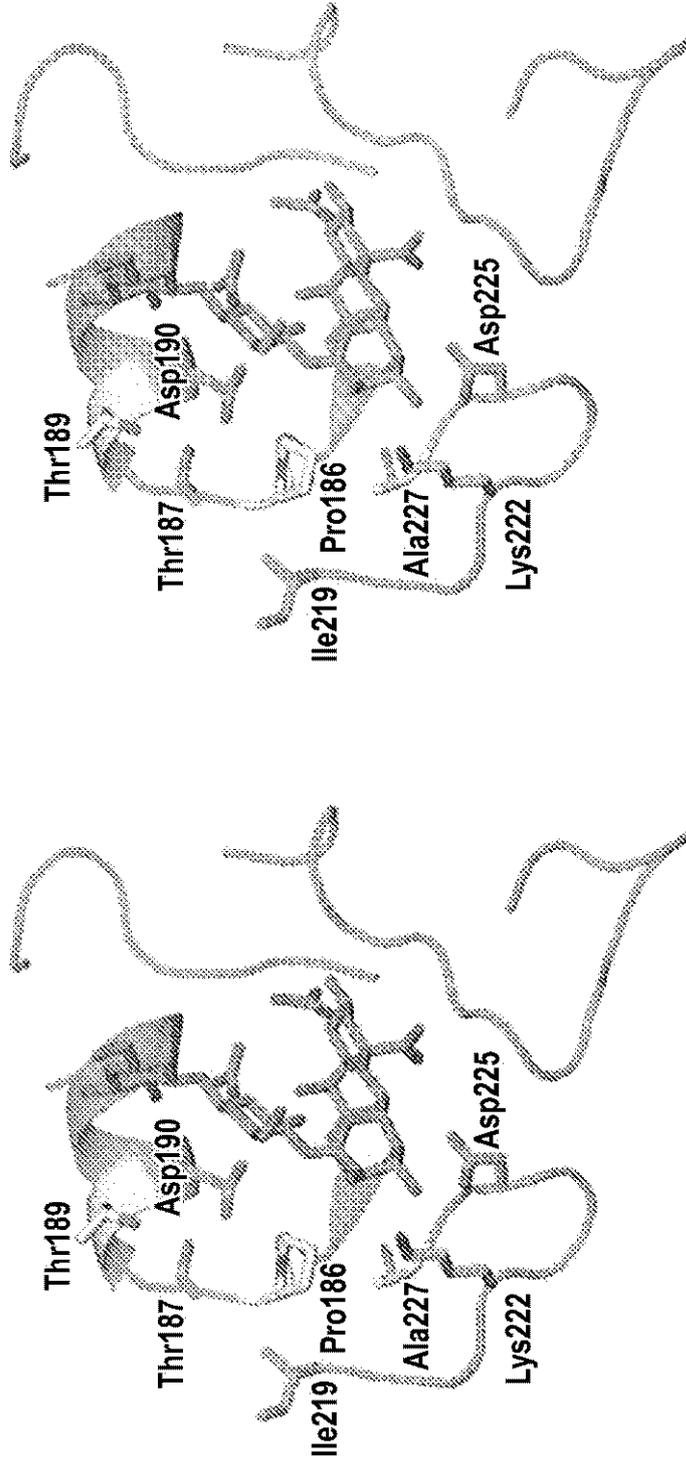


FIG. 13C

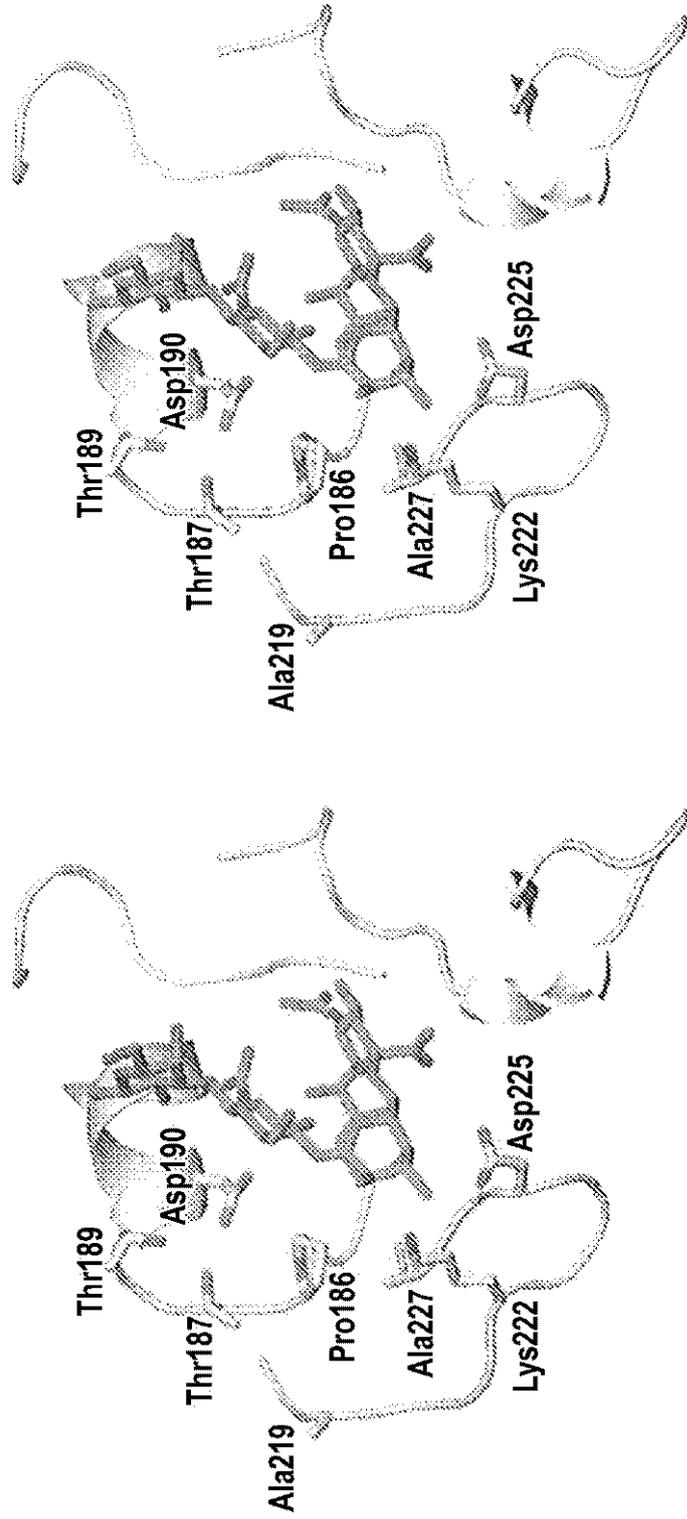


FIG. 13D

Glicano	Nomenclatura expandida
3'SLN	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-
6'SLN	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-
3'SLN-LN	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-
6'SLN-LN	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-
3'SLN-LN-LN	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-

Clave: Neu5Ac: ácido N-acetil D-neuramínico; Gal: D-galactosa;

GlcNAc: N-acetil D-glucosamina. α / β : configuración anómérica de los azúcares de piranosa.

Todos los azúcares se unen mediante un espaciador con biotina (-Sp-LC-LB-biotina como se describe en <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecored5.shtml>)

FIG. 14

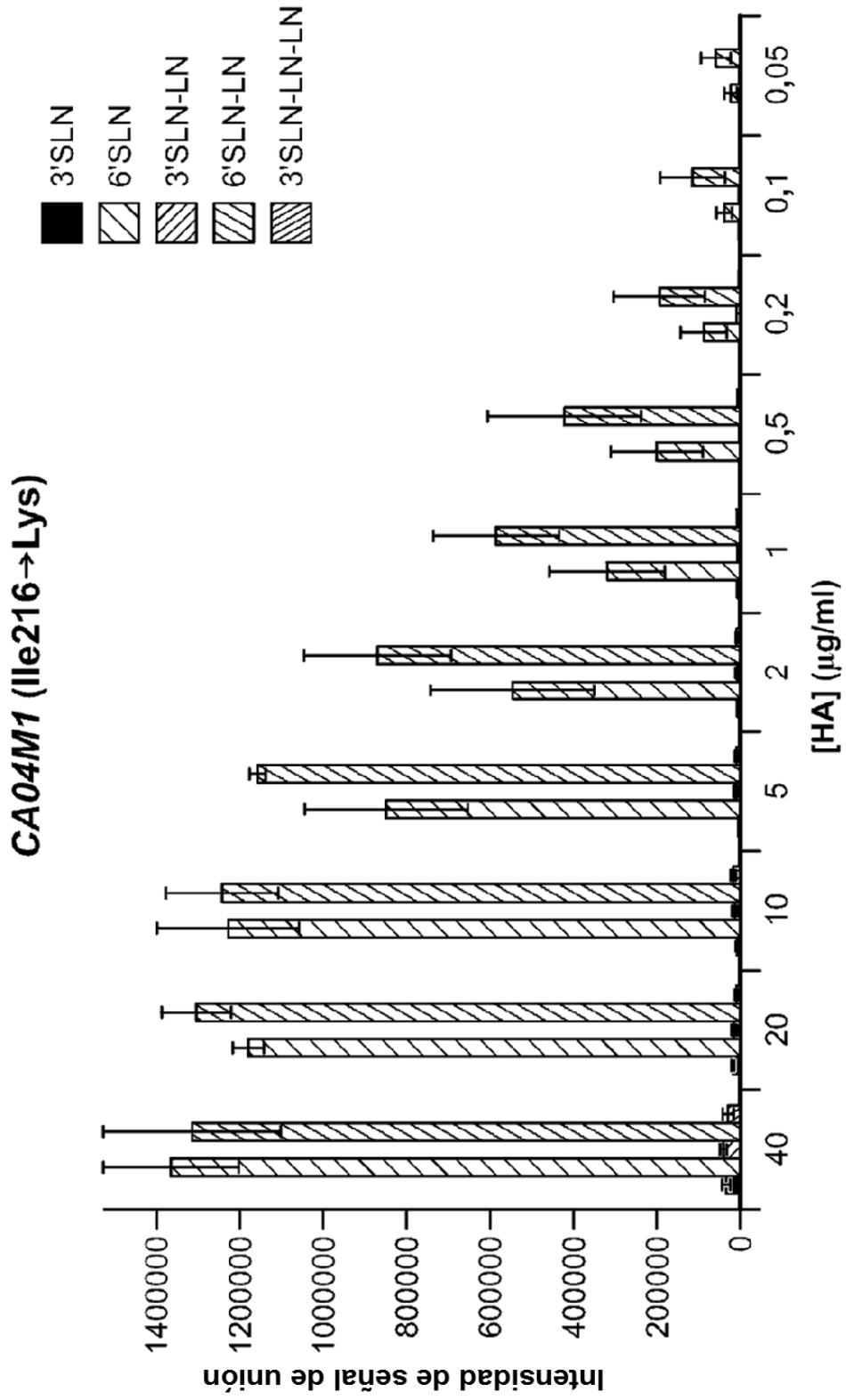


FIG. 15A

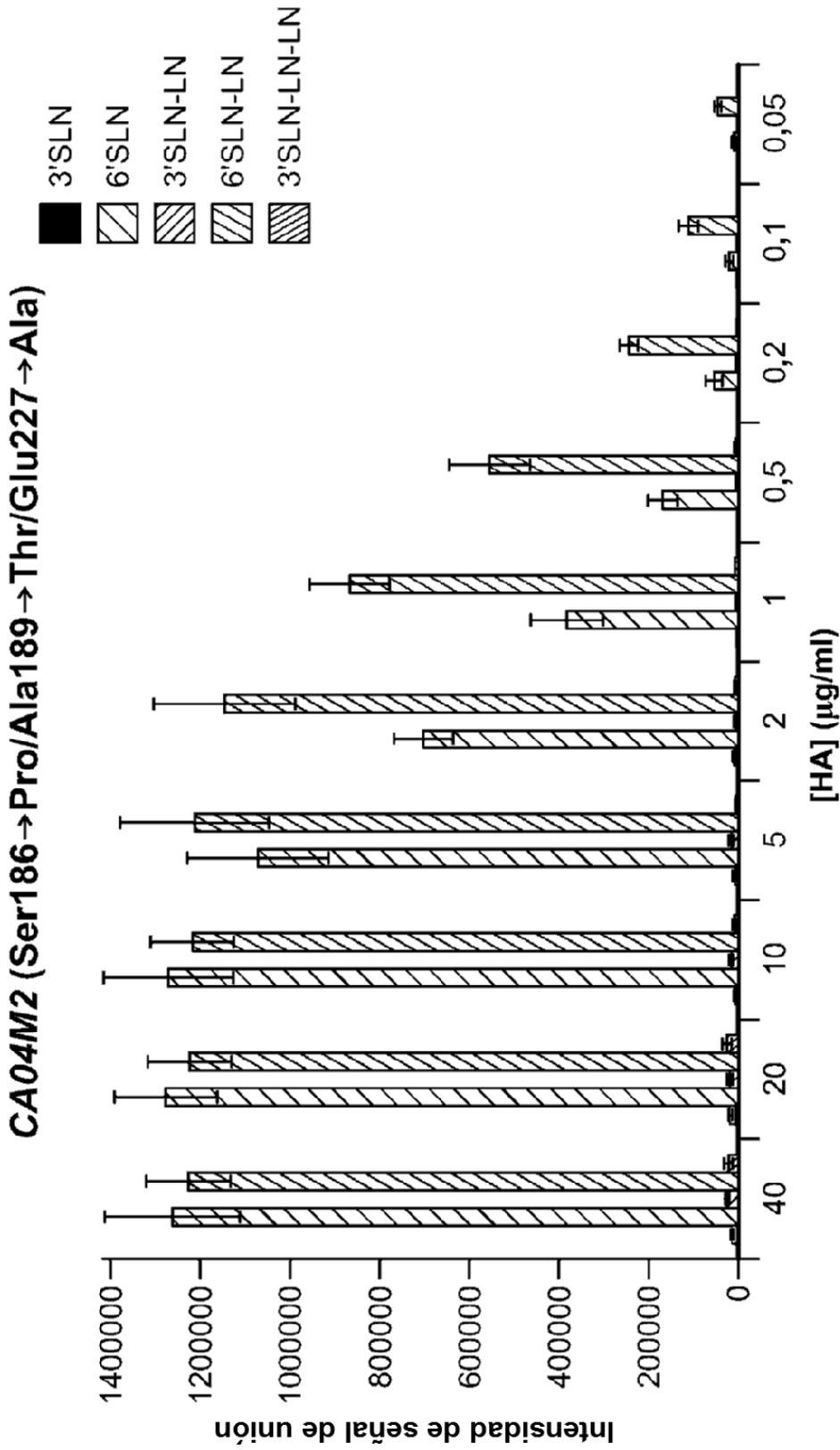


FIG. 15B

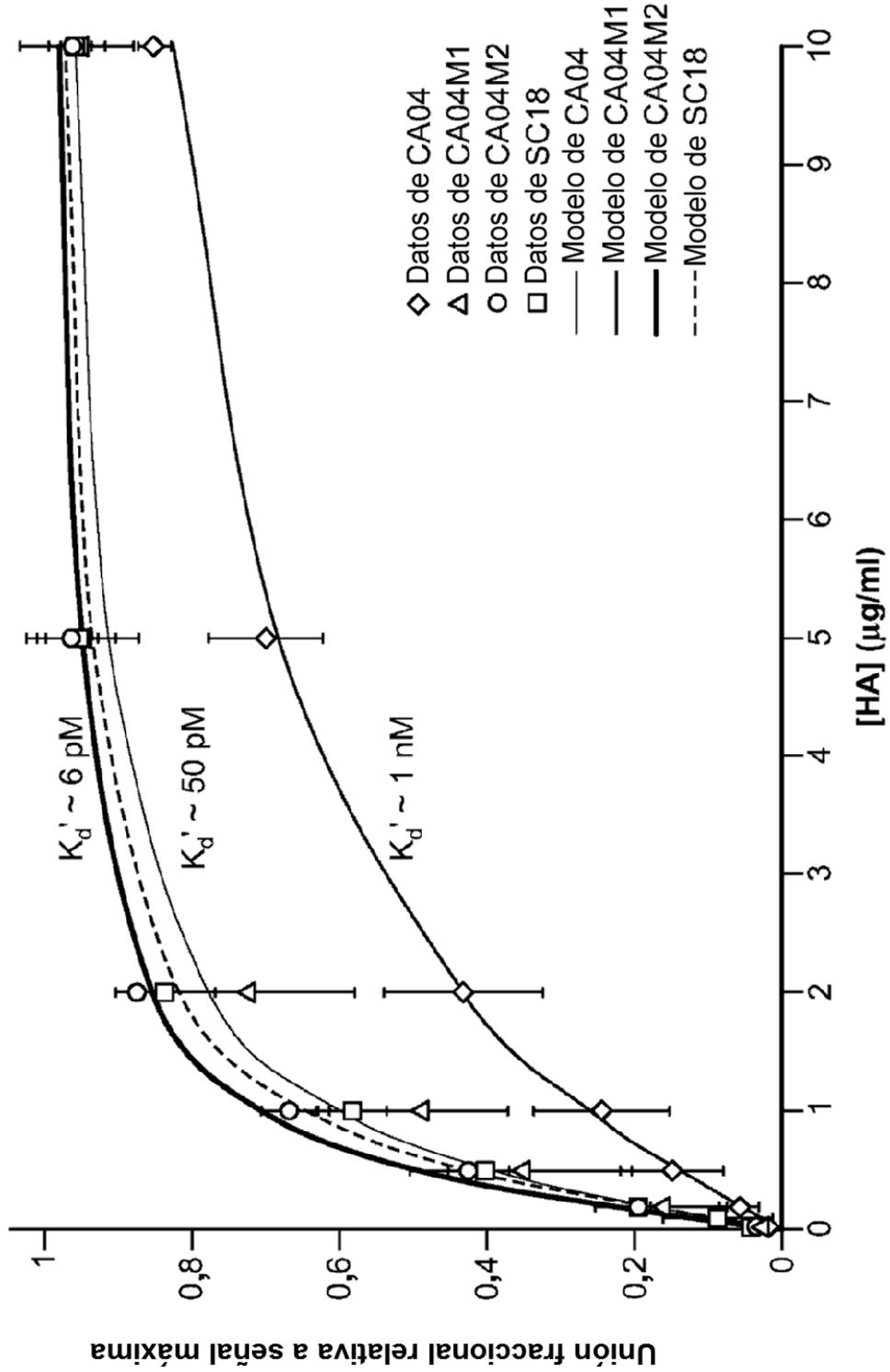


FIG. 15C

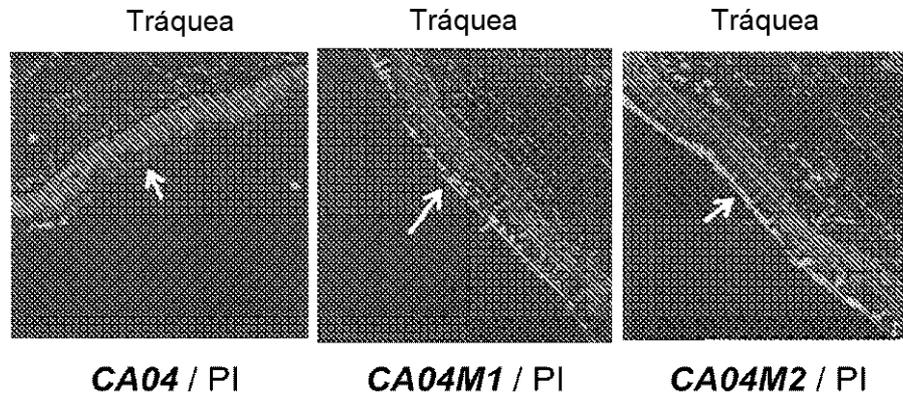


FIG. 15D

FIG. 16

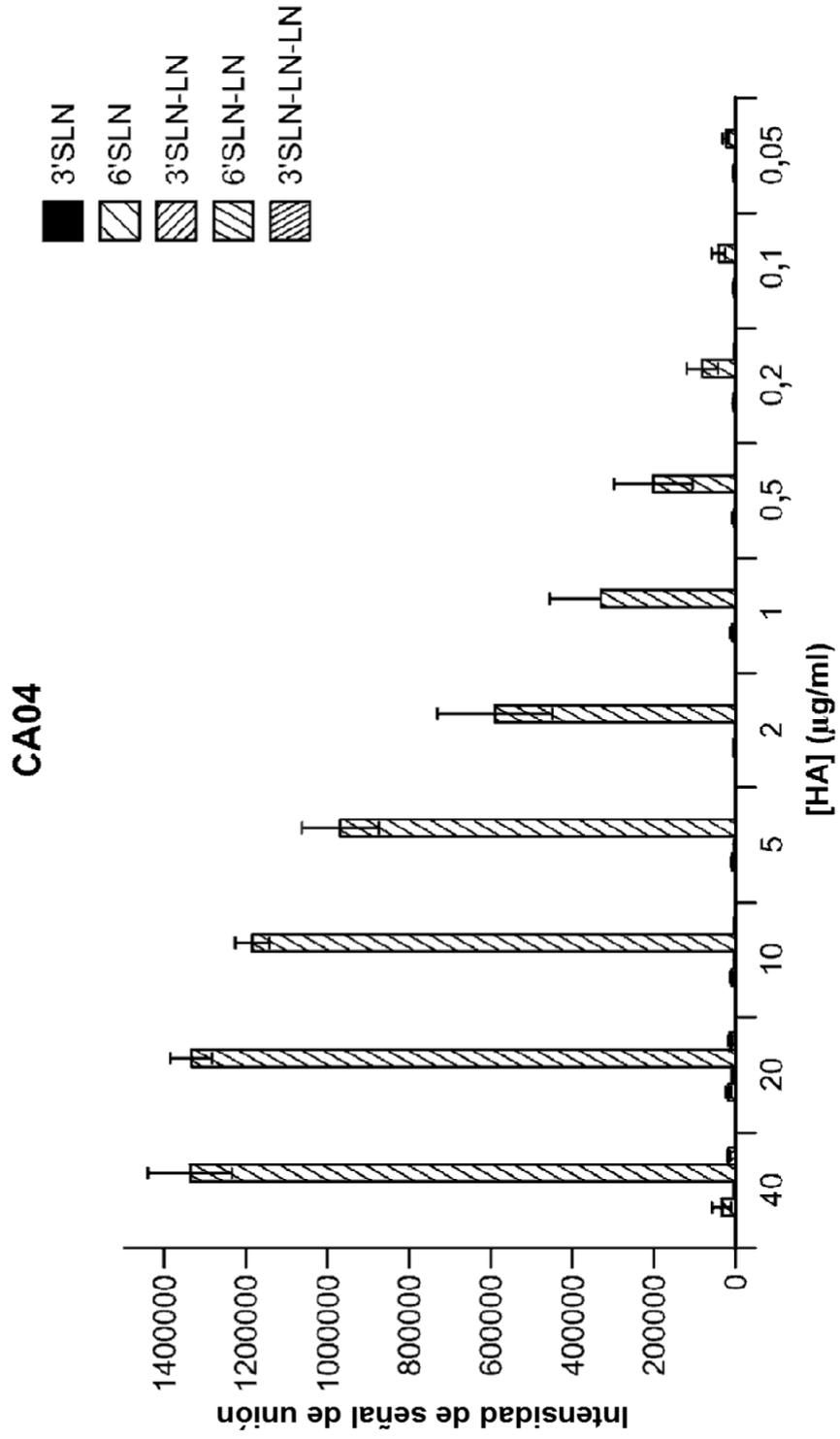


FIG. 16 (continuación)

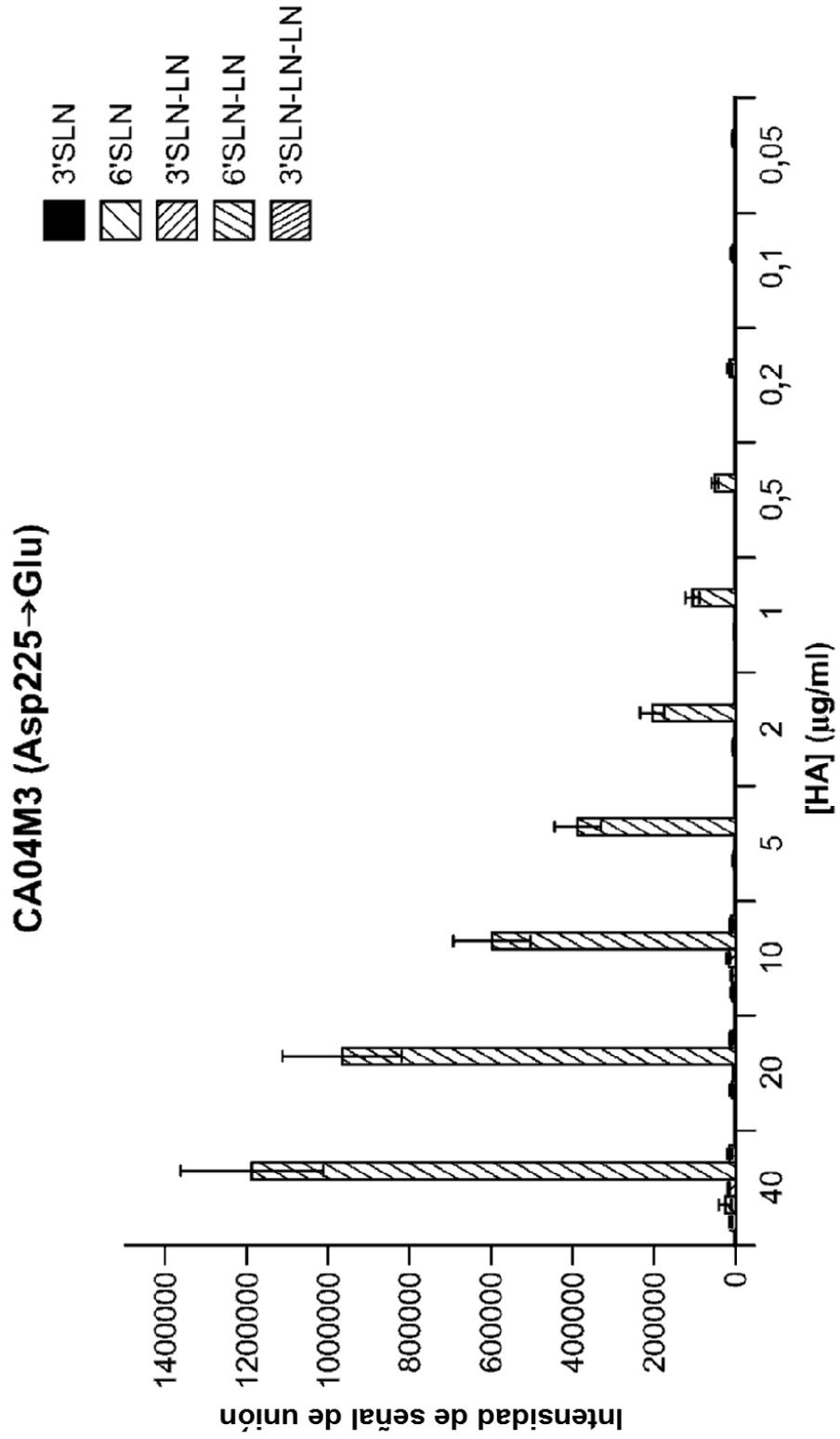


FIG. 16 (continuación)

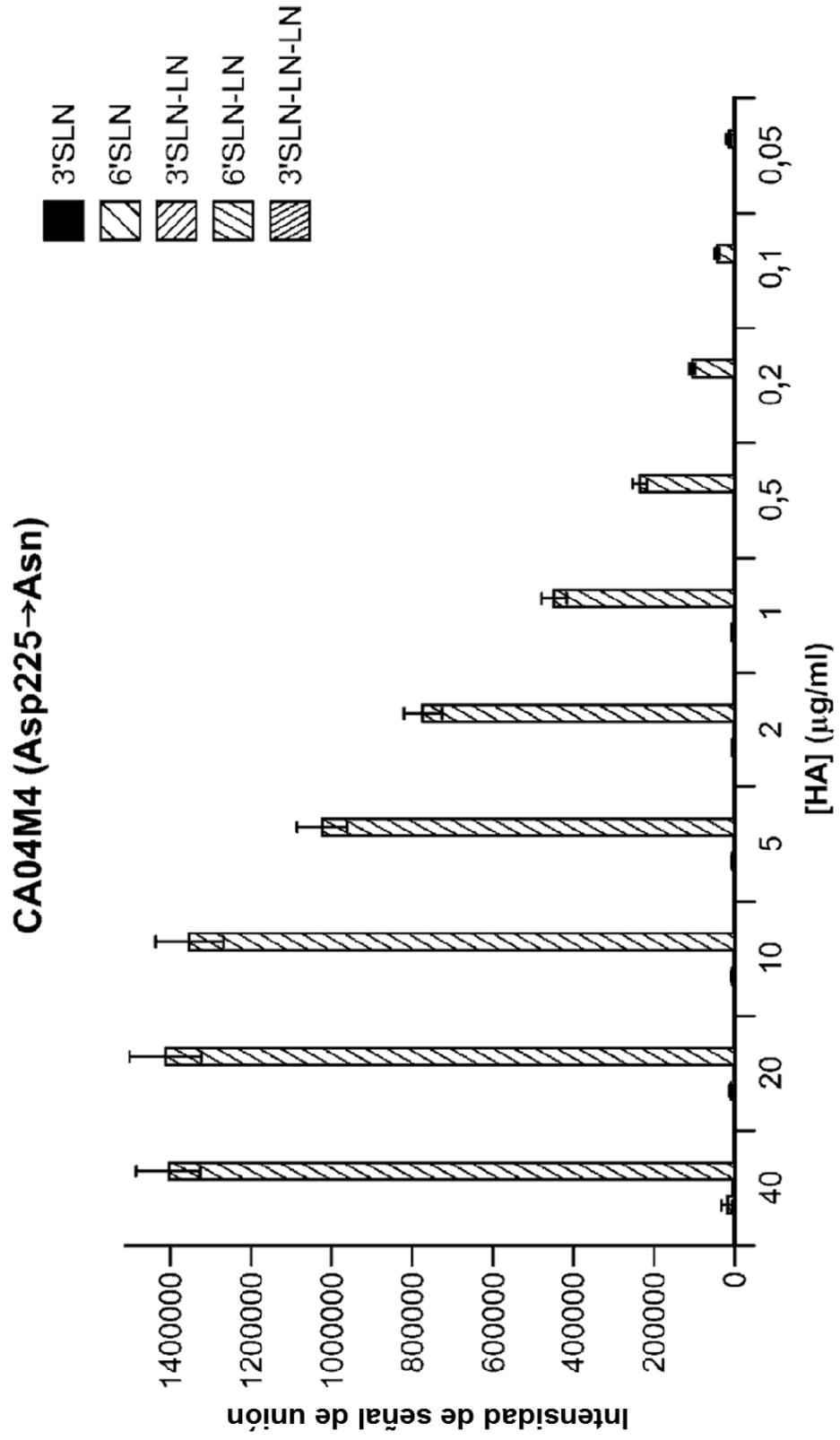


FIG. 16 (continuación)

