

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 381**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 2/00 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08779763 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2170365**

54 Título: **Composiciones y métodos de inhibición de la gripe**

30 Prioridad:

25.06.2007 US 937120 P

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

05.09.2016

73 Titular/es:

**AUTOIMMUNE TECHNOLOGIES, LLC (50.0%)
1010 Common Street Suite 1705
New Orleans, LA 70112, US y
THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GARRY, ROBERT F. y
WILSON, RUSSELL B.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 581 381 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 de inhibición de la gripe

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden péptidos eficaces para prevenir o inhibir la infección viral de una célula por un virus de la gripe. Se desvelan métodos para tratar o prevenir infecciones de gripe con los mismos.

10

Antecedentes de la invención

Todos los virus deben unirse con sus células diana e invadirlas para replicarse. Para los virus con envoltura, incluyendo los virus de ARN que tienen proteínas de fusión de membrana de clase I; el proceso implica (a) la unión del virión con la célula diana, (b) la fusión de la envoltura del virus con la membrana plasmática o con una membrana celular interna, (c) la desestabilización de la envoltura viral y de la membrana celular en el área fusionada para crear un poro de fusión, (d) la transferencia del ARN viral a través del poro y (e) la modificación de la función celular por el ARN viral.

15

20

Las etapas (b) y (c) anteriores, que implican la fusión de la membrana del virus y de la envoltura celular, están mediadas por la interacción de una glucoproteína de transmembrana viral (proteína de fusión) con proteínas de superficie y membranas de la célula diana. Estas interacciones provocan cambios conformacionales en la proteína de fusión que dan como resultado la inserción de un péptido de fusión viral en la membrana de célula diana. Tras esta inserción se producen cambios conformacionales adicionales dentro de la proteína de fusión, que ponen a la

25

envoltura viral y a las membranas celulares en estrecha proximidad y da como resultado la fusión de las dos bicapas de membrana.

Si este proceso de fusión se altera el virus no puede proliferar y propagarse dentro de su hospedador. La alteración intencionada de este proceso de fusión puede efectuarse dirigiendo péptidos y peptidomiméticos homólogos a

30

secuencias de proteínas de fusión, anticuerpos que reconocen la proteína de fusión, y otros factores que actúan contra la proteína de fusión.

La hemaglutinina 2 (HA2), una proteína de la envoltura del virus de la gripe, un ortomixovirus, es la proteína de fusión de virus de ARN prototípico de Clase 1. HA2 contiene un dominio hidrófobo amino terminal, denominado péptido de fusión, que se expone durante la escisión de la proteína precursora de hemaglutinina. Las proteínas transmembrana retrovirales contienen varias características estructurales en común con la estructura conocida de HA2 además del péptido de fusión, incluyendo una hélice amino terminal extendida (hélice N, habitualmente una "repetición en héptada" o "cremallera de leucina"), una hélice carboxilo terminal (hélice C) y un motivo aromático próximo al dominio transmembrana. La presencia de al menos cuatro de estos cinco dominios define una proteína de envoltura viral como una proteína de fusión de Clase I.

35

40

La Figura 1 muestra los cinco dominios previamente descritos de las proteínas de fusión de las seis familias de virus de Clase I. Las proteínas de fusión se originan en un péptido de fusión hidrófobo, terminan en un péptido de anclaje e incorporan una hélice alfa amino terminal extendida (hélice N, habitualmente una "repetición en héptada" o "cremallera de leucina"), una hélice alfa carboxilo terminal (hélice C) y en ocasiones un motivo aromático próximo a la envoltura del virión. También se muestra, para cada una de las familias virales, un sexto dominio, denominado en el presente documento la región de inicio de la fusión (FIR, *fusion initiation region*), que han descubierto los presentes inventores y se ha desvelado en el documento WO 2005/044992.

45

50

Aproximadamente del 10 al 20 % de la población de Estados Unidos padece gripe estacional cada año. Aunque la mayoría de los individuos se recuperan de la gripe al cabo de una a dos semanas, los muy jóvenes, los ancianos y las personas con afecciones mediales crónicas pueden desarrollar neumonía postgripal y otras complicaciones letales. El agente causante de la gripe, es el virus de la gripe, un ortomixovirus que desarrolla fácilmente nuevas cepas mediante un proceso de redistribución y mutación del genoma viral segmentado.

55

Cepas muy virulentas del virus de la gripe de tipo A pueden producir epidemias y pandemias. En los últimos años, ha habido una aparición de una cepa muy patogénica del virus de la gripe aviar A subtipo H5N1 capaz de infligir una alta tasa de mortalidad. Debido al riesgo planteado por el virus de la gripe, tanto para la salud pública como como un posible agente de bioterrorismo, el desarrollo de productos terapéuticos para combatir la gripe estacional y la amenaza creciente de gripe pandémica en una prioridad alta.

60

Sumario de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones. La presente divulgación proporciona péptidos, análogos peptídicos, derivados peptídicos y composiciones farmacéuticas útiles para tratar o prevenir infecciones por gripe y/o evitar la transmisión entre personas de una infección por gripe. Un péptido de la divulgación puede comprender una

65

parte inhibidora de la fusión de célula- virus de la gripe de la región de inicio de la fusión (FIR) de una proteína hemaglutinina 2 de gripe de tipo silvestre o una variante de la misma. La variante difiere de la proteína de tipo silvestre por sustituciones seleccionadas en la secuencia de restos de aminoácidos de la secuencia de la proteína hemaglutinina 2 de tipo silvestre. Un péptido aislado de la divulgación consiste en de 8 a 40 restos de aminoácidos consecutivos de una parte de una proteína hemaglutinina 2 de gripe de tipo silvestre seleccionada o una variante de la misma. La parte de la proteína hemaglutinina 2 comprende la región de inicio de la fusión (FIR) de la proteína y hasta cinco restos de aminoácidos en los extremos amino terminal y carboxilo terminal de la FIR. La parte también incluye al menos la secuencia YNAELL (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma que difiere de SEQ ID NO: 1 en una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y1S, Y1T, Y1W, Y1A, N2Q, A3L, A3I, A3V, E4D, E4K, E4R, E4H, L5I, L5V, L5A, L6I, L6V, y L6A. La variante puede diferir del tipo silvestre seleccionado.

La variante puede diferir de la secuencia de tipo silvestre seleccionada en una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la parte de la proteína de tipo silvestre seleccionada indicada anteriormente. Las sustituciones pueden seleccionarse de restos de aminoácidos correspondientes de otras proteínas hemaglutinina 2 de gripe de tipo silvestre o sustituciones conservativas de los restos de tipo silvestre, y preferentemente se seleccionan para mantener un perfil de hidropatía interfacial de Wimley-White para la variante que tiene máximos locales y mínimos locales en el perfil a una distancia de aproximadamente 5 restos de aminoácidos de los máximos locales y mínimos locales del perfil de hidropatía interfacial de Wimley-White de la región correspondiente de al menos una secuencia de aminoácidos de hemaglutinina 2 de tipo silvestre. Preferentemente, la variante de la secuencia de tipo silvestre seleccionada comparte al menos 50 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de tipo silvestre.

Un péptido de la divulgación puede comprender una parte de 8 a 40 restos de aminoácidos de la RIF de una proteína hemaglutinina 2 de gripe A o gripe B de tipo silvestre de una región de la proteína en el intervalo de restos 72 a 113, o una variante de la misma que difiere de los restos 72 a 113 de la secuencia de tipo silvestre en una o más sustituciones de restos de aminoácidos en la secuencia de tipo silvestre. Las sustituciones en la variante se seleccionan de restos de aminoácidos correspondientes de otras proteínas hemaglutinina 2 de tipo silvestre o sustituciones conservativas de las mismas, y preferentemente se seleccionan para conservar la forma general del perfil de hidropatía de Wimley-White de los péptidos, es decir, para mantener un perfil de hidropatía de Wimley-White para la variante que tenga máximos locales y mínimos locales a una distancia de aproximadamente 5 restos de aminoácidos de los máximos locales y mínimos locales de perfil de hidropatía de Wimley-White de la secuencia de aminoácidos de hemaglutinina 2 de tipo silvestre correspondiente. Preferentemente, las variantes en esta realización difieren de la secuencia de tipo silvestre en una sustitución conservativa.

Un péptido de la divulgación puede consistir en de 8 a 40 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSD) o una variante de la misma. La SEQ ID NO: 2 abarca restos de aminoácidos 72 a 113 de la proteína hemaglutinina 2 del subtipo H3 de gripe A de tipo silvestre (SEQ ID NO: 19). El péptido de 8 a 40 aminoácidos comprende al menos los restos de aminoácidos 23 a 28 de SEQ ID NO: 2 o de la variante. En esta realización, la variante difiere de SEQ ID NO: 2 en una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en EID, EIN, E1Q, V2G, V2S, V2T, V2I, V2L, V2A, V2M, V2C, E3D, E3N, E3Q, G4T, G4S, G4K, G4R, G4H, G4Q, G4N, R5K, R5H, R5Q, R5N, I6L, I6V, I6A, I6M, I6C, Q7N, Q7E; Q7D Q7G, Q7S, Q7T, D8E, D8N, D8Q, D8M, D8C, L9I, L9V, L9A, L9M, L9C, E10D, E10N, E10Q, E10I, E10L, E10V, E10A, E10M, E10C, K11R, K11H, K11D, K11E, K11N, K11Q, Y12W, Y12K, Y12R, Y12H, V13I, V13L, V13A, V13G, V13T, V13S, V13M, V13C, 14D, E14K, E14R, E14H, D15E, D15R, D15N, D15Q, T16G, T16S, T16A, T16Q, T16N, K17F, K17R, K17M, K17C, K17I, K17V, K17L, K17A, I18L, I18V, I18A, I18T, I18S, I18G, I18Q, I18N, D19E, D19N, D19Q, L20I, L20V, L20A, L20C, L20M, W21Y, W21A, S22T, S22G; S22A, S22M, S22C, Y23W, Y23S, Y23T, Y23A, N24Q, N24D, N24E, A25I, A25V, A25L, A25M, E26D, E26K, E26R, E26H, L27A, L27I, L27V, L27M, L28I, L28V, L28A, L28M, V29I, V29L, V29A, V29M, A30I, A30L, A30V, A30M, A30C, L31I, L31V, L31A, L31M, L31C, E32D, E32N, E32Q, N33Q, N33Q, Q34E, N33E, Q34E, Q34D, Q34G, Q34S, Q34T, H35K, H35R, H35N, H35Q, T36S, T36G, I37L, I37V, I37A, I37M, I37C, D38E, D38N, D38Q, L39F, L39I, L39V, L39M; L39C, L39A, L39E, L39D, L39N, L39Q, T40H, T40R, T40K, T40S, T40G, T40A, T40M, D41E, D41N, D41Q, S42G, S42T, S42I, S42L, S42V, S42A, S42M, y S42C.

El péptido de la divulgación puede ser un péptido que consiste en al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3-13, que representan partes de la RIF de una proteína hemaglutinina 2 de gripe A de tipo silvestre (HA2) o hemaglutinina de gripe B (HB). El péptido puede consistir en al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de una variante de una cualquiera de SEQ ID NO: 3-13. La variante puede diferir de la secuencia seleccionada en una o más sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones conservativas, análogas a las descritas anteriormente.

Cuando se administró en las cavidades nasales de hurones, un péptido de la invención, denominado en el presente documento inhibidor 3 gripal (F3, *flu inhibitor 3*), bloqueó eficazmente el desarrollo de la gripe en los animales y la transmisión de la gripe de un animal a otro. La secuencia de aminoácidos de F3 es idéntica a los restos 84-99 de la HA2 o de la mayoría de los virus de subtipo H3 de gripe A, incluyendo las cepas A/H3N2 que circulan en la actualidad en seres humanos. F3 también es activo contra un virus de la gripe H5N1 recombinante y contra dos

cepas de gripe B (B/Shanghai/361/2002 y B/Shanghai/10/2003), *in vitro*, en ensayos de inmunoplasmas con CI_{50} en el intervalo nM bajo (<5 nM). Dada la diversidad de estas cepas diferentes de gripe A y B, probablemente F3 sea eficaz contra la mayoría de los virus de la gripe.

5 En otros aspectos, la presente divulgación proporciona análogos de un péptido de la invención (por ejemplo, péptidos cíclicos, o péptidos que contienen un aminoácido no natural), derivados de un péptido o un análogo de la divulgación en los que el péptido o análogo incluye un grupo no derivado de HA2 unido a un resto del péptido (por ejemplo, un lípido o una secuencia peptídica de HA2 distinta de gripe), y un anticuerpo aislado que es específico para (es decir, es capaz de unirse de un modo específico y selectivo con) un péptido, análogo o derivado de la invención.

10 Otro aspecto de la divulgación es el uso de un péptido, análogo, derivado o anticuerpo de la divulgación en un método terapéutico para tratar o prevenir una infección por gripe. Este uso puede incluir el uso del péptido, análogo, derivado o anticuerpo de la invención para preparar un medicamento para tratar la gripe. Los péptidos, análogos, derivados y anticuerpos de la divulgación pueden incluirse en una composición farmacéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra los cinco dominios previamente identificados de las proteínas de fusión de las seis familias de virus de tipo I, así como el sexto dominio conocido como la región de inicio de fusión (FIR).

La Figura 2 muestra un alineamiento de secuencias de variantes de HA2 H1 (SEQ ID NO: 17), H2 (SEQ ID NO: 18), H3 (SEQ ID NO: 19), H4 (SEQ ID NO: 20), H5 (SEQ ID NO: 21), H6 (SEQ ID NO: 22), H7 (SEQ ID NO: 23), H9 (SEQ ID NO: 24), H10 (SEQ ID NO: 25), H13 (SEQ ID NO: 26), H14 (SEQ ID NO: 27), H15 (SEQ ID NO: 28), y H16 (SEQ ID NO: 29).

25 La Figura 3 muestra la secuencia de restos de aminoácidos de hemaglutinina 2 de gripe B, B/Yamagata/16/1988 (SEQ ID NO: 30).

La Figura 4 muestra una comparación de los restos 72-113 de proteínas hemaglutinina 2 de gripe A y gripe B, específicamente restos 72-113 de subtipos de gripe A H1 (SEQ ID NO: 17), H2 (SEQ ID NO: 18), H3 (SEQ ID NO: 19), H4 (SEQ ID NO: 20), H5 (SEQ ID NO: 21), H6 (SEQ ID NO: 22), H7 (SEQ ID NO: 23), H9 (SEQ ID NO: 24), H10 (SEQ ID NO: 25), H13 (SEQ ID NO: 26), H14 (SEQ ID NO: 27), H15 (SEQ ID NO: 28), H16 (SEQ ID NO: 29), y de hemaglutinina 2 de gripe B/Yamagata/16/1988 (SEQ ID NO: 30).

La Figura 5 muestra un posible mecanismo para la fusión de célula - virus.

35 La Figura 6 muestra respuestas patológicas observadas para dos grupos de hurones expuestos a virus de la gripe A /Cal/07/04 y tratados con un péptido de la invención o un péptido de control.

La Figura 7 muestra análisis de títulos de virus de muestras de hurones tratados con un péptido de la invención o un péptido de control e infectados con virus de la gripe A/Cal/07/04.

La Figura 8 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H1.

40 La Figura 9 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H2.

La Figura 10 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H3.

45 La Figura 11 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H4.

La Figura 12 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H5.

La Figura 13 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H6.

50 La Figura 14 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H7.

La Figura 15 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H9.

55 La Figura 16 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H10.

La Figura 17 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H13.

La Figura 18 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H14.

60 La Figura 19 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H15.

La Figura 20 muestra una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White para hemaglutinina 2 de gripe A H16.

65

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente divulgación proporciona péptidos, análogos peptídicos, derivados peptídicos, anticuerpos y composiciones farmacéuticas útiles para tratar o prevenir infecciones por gripe o prevenir la transmisión entre personas de una infección por gripe. La presente divulgación utiliza péptidos que tienen similitudes de secuencias de aminoácidos con partes de la región de inicio de fusión (RIF) de proteínas hemaglutinina 2 de gripe de tipo silvestre. Los péptidos de la divulgación pueden inhibir la fusión de célula- virus de la gripe, y de este modo tratar y/o prevenir infecciones por gripe. Los péptidos de la divulgación pueden comprender partes seleccionadas de proteínas hemaglutinina 2 de virus de la gripe de tipo silvestre en la región de la FIR, o variantes de las partes seleccionadas. Las variantes difieren de la proteína de tipo silvestre por sustituciones seleccionadas en la secuencia de restos de aminoácidos de la secuencia de proteína hemaglutinina 2 de tipo silvestre. Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que los péptidos de la divulgación previenen y tratan infecciones por gripe interfiriendo con la interacción normal del dominio de la RIF de un péptido de fusión viral con una superficie de célula diana, por ejemplo interfiriendo con la agregación de proteínas o cambios conformacionales requeridos para activación o fusión.

En un primer aspecto un péptido aislado de la invención consiste en de 8 a 40 restos de aminoácidos consecutivos, preferentemente de 9 a 16 restos de aminoácidos consecutivos, de una parte de una proteína hemaglutinina 2 de gripe de tipo silvestre seleccionada que comprende la región de inicio de la fusión (FIR) de la proteína y hasta cinco restos de aminoácidos en los extremos amino terminal y carboxilo terminal de la FIR, o una variante de los mismos. El péptido de 8 a 40 aminoácidos incluye al menos la secuencia YNAELL (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma que difiere de SEQ ID NO: 1 en una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y1S, Y1T, Y1W, Y1A, N2Q, A3L, A3I, A3V, E4D, E4K, E4R, E4H, L5I, L5V, L5A, L6I, L6V y L6A. SEQ ID NO: 1 representa una de las partes más altamente conservadas de la RIF de todas las proteínas hemaglutinina 2 de gripe A caracterizadas (es decir, restos 94 a 99 de las secuencias de hemaglutinina 2 de gripe A). La secuencia de aminoácidos de la RIF incluye la parte de la proteína hemaglutinina 2 de tipo silvestre seleccionada que comienza aproximadamente en el resto 77 en la hélice N de la proteína, y que termina en un resto en el intervalo del resto 110 al resto 119 de la proteína hemaglutinina 2 de tipo silvestre seleccionada. El extremo carboxilo terminal de la RIF de la gripe, como se describe en el presente documento, es el resto inmediatamente precedente al primer resto después del resto 104 (el extremo carboxilo terminal de la hélice N) que comienza una región de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White creciente. Dicho de otro modo, la RIF se caracteriza por una secuencia de restos de aminoácidos que muestran un pico en el perfil de hidropatía interfacial de Wimley-White de la proteína hemaglutinina 2 de tipo silvestre, comenzando en la hélice N (en el resto 77) y terminando a una distancia de aproximadamente 15 restos después del extremo carboxilo terminal de la hélice N. El extremo carboxilo terminal de la región pico (es decir, la FIR) se caracteriza por un mínimo local en el perfil de hidropatía. El resto inmediatamente después del mínimo local en el extremo carboxilo terminal de la RIF comienza otro pico en el perfil de hidropatía (es decir, una región de hidrofobicidad interfacial creciente).

En este primer aspecto, la variante difiere de la secuencia de tipo silvestre seleccionada en una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la parte de la proteína de tipo silvestre seleccionada indicada anteriormente. Las sustituciones se seleccionan de restos de aminoácidos correspondientes de otras proteínas hemaglutinina 2 de la gripe de tipo silvestre o sustituciones conservativas de los restos correspondientes, y preferentemente se seleccionan para mantener un perfil de hidropatía interfacial de Wimley-White para la variante que tiene máximos locales y mínimos locales en el perfil a una distancia de aproximadamente 5 restos de aminoácidos en los máximos locales y mínimos locales del perfil de hidropatía interfacial de Wimley-White de la región correspondiente de al menos una secuencia de aminoácidos de la RIF de hemaglutinina 2 de tipo silvestre. Por ejemplo, la hemaglutinina 2 de tipo silvestre puede ser de un subtipo seleccionado del grupo que consiste en las variantes H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H15, y H16 de hemaglutinina 2 de la gripe A (SEQ ID NO: 17-29), o puede ser de una proteína hemaglutinina 2 de la gripe B (SEQ ID NO: 30). Las secuencias de aminoácidos de hemaglutinina 2 de gripe A subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H15, y H16 se muestran en la Figura 2, con las regiones RIF encerradas en un perfil negro. La secuencia de aminoácidos de hemaglutinina 2 de gripe B (SEQ ID NO: 30) se muestra en la Figura 3. Preferentemente, la variante de la secuencia de tipo silvestre seleccionada comparte al menos 50 por ciento de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % de identidad de secuencia) con la secuencia de tipo silvestre.

En un segundo aspecto, un péptido de la divulgación comprende de 8 a 40, preferentemente de 9 a 16, restos de aminoácidos consecutivos de los restos 72 a 113 de la RIF de una proteína hemaglutinina 2 de gripe A o gripe B de tipo silvestre, o una variante de la misma que difiere de los restos 72 a 113 de la secuencia de tipo silvestre en una o más sustituciones de restos de aminoácidos. Las sustituciones en la variante se seleccionan de restos de aminoácidos correspondientes de otras proteínas hemaglutinina 2 de tipo silvestre o sustituciones conservativas de los mismos, y preferentemente se seleccionan para conservar la forma general del perfil de hidropatía de Wimley-White del péptido de tipo silvestre, es decir, para mantener un perfil de hidropatía de Wimley-White para la variante que tiene máximos locales y mínimos locales a una distancia de aproximadamente 5 restos de aminoácidos de los máximos locales y mínimos locales de perfil de hidropatía de Wimley-White de la secuencia de aminoácidos de hemaglutinina 2 de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, preferentemente, las variantes en esta realización contienen sustituciones conservativas de ciertos restos de aminoácidos de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, la expresión “sustituciones conservativas” y variantes gramaticales de la misma, se refiere a la presencia de un resto de aminoácido en la secuencia peptídica que es diferente de, pero que está en la misma clase de aminoácido que, la del resto de tipo silvestre (es decir, un resto no polar que reemplaza a un resto no polar, un resto aromático que reemplaza a un resto aromático, un resto polar sin carga que reemplaza a un resto polar sin carga, un resto con carga que reemplaza a un resto con carga). Además, las sustituciones conservativas pueden abarcar un resto que tiene un valor de hidropatía interfacial del mismo signo y en general de magnitud similar a la del resto de tipo silvestre que reemplaza.

Como se usa en el presente documento, la expresión “resto no polar” se refiere a glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y prolina; la expresión “resto aromático” se refiere a fenilalanina, tirosina y triptófano, la expresión “resto polar sin carga” se refiere a serina, treonina, cisteína, metionina, aspargina y glutamina; la expresión “resto con carga” se refiere a los aminoácidos con carga negativa ácido aspártico y ácido glutámico, así como los aminoácidos con carga positiva lisina, arginina e histidina.

La Figura 4 compara los restos 72-113 de cada uno de los subtipos de hemaglutinina 2 de gripe A mostrados en la Figura 2, junto con la región correspondiente de la hemaglutinina 2 de gripe B (es decir, restos 72-113 de SEQ ID NO: 30). Como resulta evidente en la Figura 4, hay similitudes de secuencia significativas entre los diferentes subtipos de hemaglutinina. La región de restos 72-113 de cada uno de los subtipos de hemaglutinina 2 de gripe A comparte 50 por ciento o más de identidad de secuencia con la región correspondiente del subtipo H3 (es decir, SEQ ID NO: 2). Los porcentajes de identidades de secuencia entre la SEQ ID NO: 2 y los restos 72-113 de los diversos otros subtipos son los siguientes: H4 y H14 comparten aproximadamente 95,2 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; H7 y H15 comparten aproximadamente 59,5 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; H10 y H16 comparten aproximadamente 54,7 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; H5 y H6 comparten aproximadamente 52 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y H1, H2, H9 y H13 comparten 50 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Los restos 72-113 de la hemaglutinina 2 de gripe B comparten aproximadamente 30,9 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; sin embargo, las diferencias entre SEQ ID NO: 2 y los restos 72-113 de la proteína de gripe B son sustituciones predominantemente conservativas.

Como resulta evidente en las Figuras 2, 3 y 4, las proteínas hemaglutinina 2 de tipo silvestre conocidas tienen colectivamente restos de aminoácidos en posiciones en el intervalo de restos 72-113 que pertenecen a más de una clase de aminoácido. En consecuencia, en dicho caso, las variantes de los péptidos de la invención también pueden incluir sustituciones de aminoácidos de más de una clase de aminoácido en dichas posiciones. Preferentemente, la variante de la secuencia de tipo silvestre seleccionada comparte al menos 50 por ciento de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % de identidad de secuencia) con la secuencia de tipo silvestre.

En un tercer aspecto, un péptido de la invención consiste en de 8 a 40 restos de aminoácidos consecutivos, preferentemente de 9 a 16 restos de aminoácidos consecutivos, de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSD) o una variante de la misma. SEQ ID NO: 2 es una parte de la proteína hemaglutinina 2 de gripe A subtipo H3 de tipo silvestre que abarca los restos de aminoácidos 72 a 113 de la misma. En este aspecto, el péptido comprende al menos los restos de aminoácidos 23 a 28 de SEQ ID NO: 2 o de la variante de la misma, y la variante difiere de SEQ ID NO: 2 en una o más sustituciones de aminoácidos. La o las sustituciones de restos de aminoácidos en la secuencia variante se seleccionan del grupo de sustituciones mostradas en la Tabla 1. Preferentemente, la variante comparte al menos 50 por ciento de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % de identidad de secuencia) con SEQ ID NO: 2. En la Tabla 1, se prefiere la primera columna de sustituciones, se prefiere más la segunda columna de sustituciones y son más conservativas que las de la primera columna, mientras que la tercera columna de sustituciones son alternativas que pueden incluirse en los péptidos de la divulgación.

Tabla 1. Sustituciones en SEQ ID NO: 2.

Posición	Sustituciones preferidas	Sustituciones más preferidas	Sustituciones preferidas alternativas
1	E1D, E1N, E1Q	E1D, E1N, E1Q	
2	V2G, V2S, V2T, V2I, V2L, V2A, V2M, V2C	V2S, V2T, V2I, V2L, V2A, V2M	
3	E3D, E3Q, E3N	E3D	
4	G4T, G4S, G4K, G4R, G4H, G4Q, G4N	G4T, G4S, G4K, G4R, G4H, G4Q, G4N	
5	R5K, R5H, R5Q, R5N	R5K, R5Q, R5N	
6	I6L, J6V, I6A, I6M, I6C	I6L, I6V, I6A, I6M	
7	Q7N, Q7E, Q7D, Q7G, Q7S, Q7T	Q7N, Q7E, Q7D, Q7G	
8	D8E, D8N, D8Q, D8M, D8C	D8E, D8N, D8Q, D8M	

ES 2 581 381 T3

Posición	Sustituciones preferidas	Sustituciones más preferidas	Sustituciones preferidas alternativas
9	L9I, L9V, L9A, L9M, L9C	L9I, L9V, L9A, L9M	
10	E10D, E10N, E10Q, E10I, E10L, E10V, E10A, E10M, E10C	E10D, E10N, E10Q, E10I, E10L, E10V, E10A	
11-12	K11R, K11H, K11D, K11E, K11N, K11Q	K11R, K11D, K11E, K11N, K11Q	
13	Y12W, Y12K, Y12R, Y12H	Y12W, Y12K, Y12R	
13	V13I, V13L, V13A, V13G, V13T, V13S, V13M, V13C	V13I, V13L, V13A, V13G, V13T, V13S, V13M	
14	E14D, E14K, E14R, E14H	E14D, E14K, E14R	E14D, E14R
15	D15E, D15R, D15N, D15Q	D15E	D15E, D15R
16	T16G, T16S, T16A, T16Q, T16N	T16G, T16S, T16Q, T16N,	I16A
17	K17F, K17R, K17M, K17C, K17I, K17V, K17L, K17A	K17F, K17M, K17I, K17V, K17L, K17A,	K17R
18	I18L, I18V, I18A, I18T, I18S, I18G, I18Q, I18N	I18L, I18V, I18A, I18T, I18S, I18Q, I18N	I18A
19	D19E, D19N, D19Q	D19E	D19E
20	L20I, L20V, L20A, L20M, L20C	L20I, L20V, L20A	L20A
21	W21Y, W21A	W21Y	W21Y, W21A
22	S22T, S22G, S22A, S22M, S22C	S22T, S22G, S22A, S22M	S22M
23	Y23W, Y23S, Y23T, Y23A,	Y23 W, Y23S	Y23W, Y23A
24	N24Q, N24D, N24E,	N24Q	N24Q
25	A25I, A25V, A25L, A25I, A25V, A25L, A25M	A25I, A25V, A25L,	A25I
26	E26D, E26K, E26R, E26H,	E26D, E26K	E26D, E26R
27	L27A, L27I, L27V, L27M	L27A, L27I, L27V	L27A
28	L28I, L28V, L28A, L28M	L28I, L28V, L28A	L28A
29	V29I, V29L, V29A, V29M	V29I, V29L, V29A	
30	A30I, A30L, A30V, A30M. A30C	A30I, A30L, A30V	
31	L31I, L31V, L31A, L31M, L31C	L31I, L31V, L31A, L31M	
32	E32P, E32Q, E32N	E32D	
33	N33Q, N33E, N33D	N33Q	
34	Q34G, Q34N, Q34E, Q34D, Q34T, Q34S	Q34G, Q34N, Q34E, Q34D	
35	H35K, H35R, H35N, H35Q	H35K, H35R	
36	T36S, T36G,	T36S	
37	I37L, I37V, I37A, I27M, I37C	I37L, I37V, I37A	
38	D38E, D38N, D38Q		
39	L39F, L39I, L39V, L39M, L39C, L39A, L39E, L39D, L39N, L39Q	L39F, L39I, L39V, L39M, L39A, L39E, L39D	
40	T40H, T40R, T40K, T40S, T40G, T40A, T40M,	T40H, T40S, T40G, T40A, T40M	
41	D41E, D41N, D41Q	D41E	
42	S42G, S42T, S42I, S42L, S42V, S42A, S42M, S42C	S42G, S42T, S42I, S42L, S42V, S42A	

En ciertos aspectos, el péptido de la divulgación es un péptido que consiste en al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 3-13), que representan partes de la RIF de una proteína hemaglutinina 2 de gripe A de tipo silvestre (HA2) o una hemaglutinina 2 de gripe B (HB). En otros aspectos, el péptido consiste en al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de una variante de una cualquiera de SEQ ID NO: 3-13. En este aspecto alternativo, la variante difiere de la secuencia seleccionada en una o más sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones conservativas, y preferentemente seleccionadas de los restos de sustitución correspondientes en cada posición del péptido como se muestra en la Tabla 1.

Además, las secuencias mostradas en la Figura 2 y en la Figura 4 indican un número de restos en negrita, que representan restos consenso en las posiciones indicadas de las secuencias de aminoácidos de hemaglutinina 2 alineadas. Como se usa en el presente documento, el término "consenso", como se aplica a un resto de aminoácido en comparación de alineamiento de secuencias de aminoácidos, se refiere a un aminoácido que aparece en una mayoría de las secuencias alineadas en una posición dada. En la Figura 2, los restos consenso son los de aminoácidos que aparecen en una posición dada en al menos siete de las trece secuencias mostradas en la figura. En la Figura 4, los restos consenso son los aminoácidos que aparecen en una posición dada en al menos ocho de las catorce secuencias mostradas en la figura. En la región de los restos 72 a 113 de las secuencias de hemaglutinina 2 comparadas en la Figura 4, los restos consenso son: V73, E74, R76, 177, L80, D86, D90, W92, S93, Y94, N95, A96, E97, L98, L99, V100, L101, L102, E103, N104, T107, D109, D112, y S113. Preferentemente, los péptidos de la divulgación, incluyendo cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, incluyen uno o más de estos restos consenso, hasta e incluyendo todos los restos consenso dentro de la región de la proteína HA2 o variantes de la misma abarcada por el péptido.

Tabla 2.

Secuencia peptídica	Identificador de secuencia	Variante de HA o HB
VEDTKIDLWSYNAELL	SEQ ID NO: 3	restos 84-99 de A/H3, A/H4 y A/H14
VDDGFLDIWTYNAELLVLL	SEQ ID NO: 4	restos 84-102 de A/H1
MEDGFLDVWTYNAELL	SEQ ID NO: 5	restos 84-99 de A/H5
TRDSMTEVWSYNAELL	SEQ ID NO: 6	restos 84-99 de A/H7
VDDQIQDIWAYNAELL	SEQ ID NO: 7	restos 84-99 de A/H9
VDDLRAADTISSQIELA	SEQ ID NO: 8	restos 84-99 de HB
MEDGFLDVWTYNAELL	SEQ ID NO: 9	restos 84-99 de A/H2 y A/H6
TKDSITDIWTYNAELL	SEQ ID NO: 10	restos 84-99 de A/H10
IDDAVTDIWSYNAKLL	SEQ ID NO: 11	restos 84-99 de A/H13
TRDSLTEIWSYNAELL	SEQ ID NO: 12	restos 84-99 de A/H15
VDDAVTDIWSYNAKLL	SEQ ID NO: 13	restos 84-99 de A/H16

Todas las secuencias de la Tabla 2 excepto la del péptido de hemaglutinina 2 de gripe B (SEQ ID NO: 8) comparten más del 50 por ciento de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, es decir, SEQ ID NO: 4, 5, 9, y 13 son 62,5 por ciento idénticas a SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 6, 7, 9, 10, 11 y 12 son 56,2 por ciento idénticas a SEQ ID NO: 3. La hemaglutinina 2 de gripe B comparte aproximadamente el 31 por ciento de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, sin embargo las diferencias entre SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 3 son predominantemente sustituciones conservativas. Además, cada uno de los péptidos representados por SEQ ID NO: 3-13 incluye uno o más de los restos consenso D86, D90, W92, S93, Y94, N95, A96, E97, L98, L99, V100, L101, y L102.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona análogos de un péptido de la invención. En un aspecto, el análogo comprende un péptido cíclico que contiene al menos dos restos de cisteína que comparten un enlace disulfuro (es decir, un puente de cistina) para formar una estructura cíclica. Cada resto de cisteína es independientemente un resto de péptido, un resto unido al extremo amino del péptido, directamente o mediante una secuencia peptídica enlazadora, o un resto unido al extremo carboxilo del péptido, directamente o mediante una secuencia peptídica enlazadora. Se sabe que las estructuras del péptido cíclico mejoran la bioestabilidad *in vivo* de muchos péptidos.

En otro aspecto, el análogo comprende al menos un resto de aminoácido no natural (por ejemplo, un resto de D aminoácido, un resto N metilado tal como N-metil valina, hidroxiprolina, ácido aminobutírico y similares). Se sabe que algunas de dichas sustituciones de aminoácidos no naturales confieren resistencia a la escisión por peptidasas en muchos compuestos peptídicos (por ejemplo, D-aminoácidos, hidroxiprolina) o aumentan el contenido alfa helicoidal del péptido (por ejemplo, ácido aminobutírico).

En otro aspecto más, el análogo puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos naturales de un resto de aminoácido del péptido con uno o más restos de prolina, glicina o ácido glutámico. Los restos de prolina y glicina pueden alterar el contenido alfa helicoidal de un péptido, si es necesario o se desea, mientras que los restos de ácido glutámico pueden aumentar el contenido alfa helicoidal del péptido.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un derivado de un péptido o un análogo de la divulgación en el que el péptido o análogo incluye un grupo adjunto. En un aspecto, el grupo adjunto es un lípido, tal como un grupo alquilo C₈ a C₂₀ o un grupo alquil carboxilato unido al péptido mediante un enlace éster, amida, éter, tioéster o tioéter. Por ejemplo, el derivado puede incluir un grupo de alquil éster graso, tal como un grupo de miristato unido a un resto del péptido. Los sustituyentes lipídicos pueden aumentar, por ejemplo, la bioestabilidad del péptido.

En otro aspecto, el derivado comprende un grupo de polietilenglicol (PEG) adjunto a un sustituyente amino, hidroxilo o tiol en una cadena lateral de uno o más de los restos de aminoácidos del péptido. Dichos derivados de PEG pueden mejorar con frecuencia la farmacocinética de proteínas, por ejemplo, inhibiendo la captación en órganos tales como el hígado, que incluyen niveles significativos de peptidasas.

En otro aspecto derivado adicional, el péptido incluye una secuencia polipeptídica no HA2 unida al extremo amino del péptido de 8 a 40 aminoácidos, al extremo carboxilo del péptido, o a ambos extremos. La secuencia no HA2 puede ser una proteína no HA2 (por ejemplo, albúmina de suero) o una parte de una proteína no HA2, o puede comprender, por ejemplo, una secuencia para ayudar a solubilizar al péptido, tal como ASKSKSK (SEQ ID NO: 15) o una variante del mismo, preferentemente añadida al extremo carboxilo del péptido.

Otro derivado preferido de la divulgación es un polipéptido aislado que comprende un primer segmento peptídico que consiste en un péptido de la invención (por ejemplo, de 8 a 40 restos de aminoácidos consecutivos de una parte de una proteína HA2 de gripe de tipo silvestre de la región de los restos 72 a 113 de la secuencia de tipo silvestre o una variante de la misma), y al menos un segmento peptídico adicional que comprende una secuencia peptídica no HA2 unida al extremo amino, al extremo carboxilo o tanto al extremo amino como al carboxilo del primer segmento peptídico.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que es específico para (es decir, es capaz de unirse específica y selectivamente con) un péptido, análogo o derivado de la invención. Dichos anticuerpos son útiles como reactivos para determinar la presencia de concentración del péptido, análogo o derivado de la invención en una muestra biológica de un sujeto que se ha tratado con una composición de la invención. Además, los anticuerpos que se dirigen a péptidos de la invención que comprenden partes de subtipos de hemaglutinina 2 de tipo silvestre pueden unirse también con las proteínas de hemaglutinina 2 naturales. Dicha unión puede proporcionar algún nivel de inhibición del proceso de fusión de célula - virus de la gripe. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado derivado de un anticuerpo de un animal no humano tal como un ratón. En la técnica se conocen bien métodos para preparar anticuerpos monoclonales a partir de una proteína o un péptido dados. Los expertos habituales en la materia también conocen métodos para preparar anticuerpos quiméricos o humanizados.

Otro aspecto de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende un péptido, análogo, derivado o anticuerpo de la invención que puede usarse en un método para tratar o prevenir una infección por gripe. En ciertos aspectos preferidos, esta composición incluye el péptido, análogo, derivado o anticuerpo de la invención en un vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable adecuado para el suministro del péptido, análogo, derivado o anticuerpo a un sujeto, por ejemplo, al conducto nasal o tracto pulmonar. En la técnica se conocen bien vehículos y transportadores adecuados para suministrar un principio activo al conducto nasal o tracto pulmonar e incluyen soluciones salinas, soluciones salinas tamponadas, polvos inhalables y similares. El vehículo también puede incluir otros principios excipientes, tales como tensioactivos, conservantes, dispersantes y similares. Las composiciones pueden suministrarse como un aerosol, como un líquido no aerosolizado, como una pomada o crema (por ejemplo, para aplicación nasal) y similares. La composición farmacéutica de la invención puede usarse como parte de un método para tratar o prevenir una infección por gripe administrando a un sujeto que padece gripe, una cantidad inhibidora de la gripe de la composición farmacéutica de la invención.

Otro aspecto de la divulgación es el uso de un péptido, análogo, derivado anticuerpo o composición farmacéutica de la invención para tratar o prevenir una infección por gripe. Esto puede incluir el uso del péptido, análogo, derivado o anticuerpo de la divulgación para preparar un medicamento para tratar la gripe.

Virus de la gripe

Existen múltiples subtipos del virus de la gripe A. Cada subtipo viral comprende una combinación específica de versiones de dos glucoproteínas que están incluidas en las envolturas de membranas lipídicas de los mismos. Las dos glucoproteínas definitorias del subtipo son la hemaglutinina 2 (HA2) y la neuraminidasa. Existen dieciséis variantes conocidas de la HA2, que se denominan H1 a H16, respectivamente, y nueve variantes conocidas de la neuraminidasa, que se denominan N1 a N9, respectivamente. Cada subtipo viral se especifica caracterizado por sus números de variante de hemaglutinina 2 y neuraminidasa. Por ejemplo, el subtipo H3N2 de la gripe A es gripe porcina, y el subtipo H5N1 es una gripe aviar.

La HA2 es la proteína de fusión de todos los virus en la familia *Orthomyxovirus*, que incluye los virus de la gripe. La RIF de cada virus de la gripe queda dentro de su glucoproteína HA2. Las secuencias de aminoácidos de trece de las dieciséis variantes HA2 conocidas, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, y H16, se

muestran en la Figura 2 (SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, y 29, respectivamente). Las secuencias de los subtipos H8, H11, y H12 no se han presentado. Las regiones de inicio de fusión de la hemaglutinina 2 H3 se han identificado ahora como los restos 77 a 119 de la secuencia de aminoácidos de H3 (SEQ ID NO: 19) como se muestra en la Figura 2.

Un péptido aislado, al que se hace referencia en el presente documento como inhibidor 3 gripal (F3), que representa la secuencia de aminoácidos VEDTKIDLWSYNAELL, SEQ ID NO: 3 (restos 84-99 de SEQ ID NO: 19; H3 HA2), se ha descubierto ahora que tiene fuertes propiedades antivirales. Un péptido aislado que comprende los mismos dieciséis aminoácidos, en la secuencia aleatoriamente desordenada SWLVNKIYLTDEVEL (SEQ ID NO: 14), no muestra propiedades antivirales discernibles. Las propiedades antivirales de F3 incluyen inhibición de unión viral, como se demuestra mediante ensayos de hemaglutinación. F3 también inhibe la unión, fusión e infección viral, como se demuestra mediante ensayos en placa.

Actividad anti virus de la gripe

El F3 tiene una fuerte actividad de inhibición de la infección frente a una amplia serie de H1, H3, H5, y virus de la gripe B, que presentan diversidad significativa tanto en la secuencia general como en la estructura de sus proteínas HA2 respectivas. El amplio espectro de actividad de F3 puede estar relacionado, al menos en parte, con el hecho de que la FIR, y particularmente la parte de la RIF representada por los restos 84-99 de todos los subtipos de gripe A y de gripe B conocidos, es una de las regiones más altamente conservadas en la proteína HA2. Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que la similitud de secuencia entre F3 y la región correspondiente (restos 84-99) de subtipos HA2 de tipo silvestre, permite al péptido unirse eficazmente o, de otro modo, interactuar con la parte correspondiente de la RIF entre subtipos de HA. Esta interacción interfiere con el funcionamiento normal de la proteína HA durante el proceso de fusión (por ejemplo, interfiriendo con la agregación de proteínas o cambios de conformación necesarios para que continúe el proceso de fusión).

El inhibidor 3 gripal, F3, se ha sintetizado en cantidades en gramos de resina de PEG-PS-PAL usando química de FMOC convencional. El producto peptídico a granel se ha purificado usando HPLC hasta > 95 % siendo el material residual principalmente péptidos relacionados más cortos. El péptido purificado se liofilizó para retirar el disolvente. El polvo liofilizado puede procesarse adicionalmente, por ejemplo, disolviéndolo en hexafluoroisopropanol y evaporando el disolvente con la ayuda de una corriente de nitrógeno ultrapuro (Praxair UHP, 99,999 %). El polvo resultante puede después reconstituirse en un momento posterior disolviendo el polvo en un tampón acuoso, tal como fosfato potásico 10 mM o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La concentración de F3 en solución puede determinarse usando la fórmula: $\text{mg/ml} = (\text{A}_{280} \times \text{mw}) / \text{e}$, en la que e representa la suma del coeficiente de extinción molecular de los dos aminoácidos cromogénicos en la secuencia de aminoácidos peptídica a 280 nm, es decir, la suma de 5560 (Trp) + 1200 (Tyr), para proporcionar $e = 6760$.

El F3 tiene fuerte actividad inhibitoria del virus de la gripe A y una base amplia y muestra inhibición picomolar en ensayos de reducción en placa. Usando un ensayo de inmunoplatea con celulosa microcristalina AVICEL® como la capa superpuesta (Matrosovich *et al.*, 2006), las placas se detectan fijando las monocapas y tñiendo con un anticuerpo específico para la nucleoproteína del virus de la gripe. En el ensayo de inhibición de péptido, el péptido se preincuba con aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (ufp) del virus durante aproximadamente 1 hora, después se usa para infectar las monocapas. Se usaron dos condiciones para la incubación: (1) condición convencional en la que el péptido se incluye en la capa superpuesta a la misma concentración que se usó en la etapa de preincubación o (2) una condición en la que el péptido no se incluye en la capa superpuesta.

La inhibición de múltiples subtipos de virus de gripe A de F3 se evaluó utilizando ensayos en placas celulares de riñón canino de Madin-Darby ("MDCK", acrónimo de *Madin-Darby Canine Kidney*) realizados usando los subtipos A/WSN/33 (H1N1) y A/Udm/72 (H3N2) de virus de gripe A. Para evaluar los efectos de estos péptidos sobre la infectividad viral se usaron diluciones de 50 μM a 2,5 μM de F3 y el péptido de control aleatoriamente desordenado (SEQ ID NO: 14). Se ensayaron seis diluciones de F3 y del péptido de control frente al subtipo viral H1N1; y se ensayaron otras seis diluciones de cada péptido frente al subtipo viral H3N2.

En la condición (1), F3 inhibió la formación de placas de tamaño normal por varias tinciones diferentes de virus de la gripe A H1N1 y H3N2 con una CI_{50} en el intervalo de aproximadamente 100 - 500 picomolar (μM). En la condición (2) la CI_{50} para inhibición de placas de tamaño normal estuvo en el intervalo de aproximadamente 10 a 100 nanomolar (nM) para F3. A concentraciones nM bajas (<10 nM) para la condición (1), o μM bajas (<10 μM) para la condición (2), resultó evidente la presencia de "miniplateas".

El péptido de control desordenado no inhibió la formación de placas de virus de gripe A en ninguna condición, lo que indica que la secuencia de aminoácidos de péptido es importante y que los efectos no específicos no pueden explicar la inhibición.

El F3 también es activo contra un virus de la gripe H5N1 recombinante y contra dos cepas de gripe B (B/Shanghai/361/2002 y B/Shanghai/10/2003), *in vitro*, en ensayos de inmunoplatea con una CI_{50} en el intervalo nM

bajo (<5 nM). Dada la diversidad de estas cepas de gripe A y B diferentes, probablemente F3 sea eficaz contra la mayoría de los virus de la gripe.

Usando los métodos enseñados en el documento WO2005/044992 la RIF de los virus de la gripe A de subtipo H1 se ha identificado ahora como los restos 77 a 110 de la secuencia de HA2 de subtipo H1 (SEQ ID NO: 17). Un péptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, denominado en el presente documento inhibidor 1 gripal (F1) también tiene fuerte actividad antiviral (picomolar) contra subtipos de virus de la gripe A tanto del subtipo H1 como del H3, en ensayos en placa. La secuencia de aminoácidos de F1 coincide con los restos 84-102 de la secuencia de RIF del subtipo H1, SEQ ID NO: 17.

Para entender mejor el mecanismo de acción de los péptidos de la invención, por ejemplo, para determinar qué etapa en el ciclo de replicación viral se inhibe por F3, F1, y péptidos inhibidores de virus de la gripe relacionados, se han realizado estudios con diversas cepas de la gripe. A números óptimos de glóbulos rojos y a concentraciones de gripe A/PR/8/34 (H1N1), tanto F3 como F1 inhibieron la hemaglutinación inducida por virus de la gripe a concentraciones de aproximadamente 10 µM. A diluciones de células y virus óptimas (1:8 para ambos), F3 inhibió la hemaglutinación a concentraciones entre 12,5 y 6,25 µM. Se obtuvieron resultados similares con otras cepas H3 y H1, es decir, cepas H1N1 A/New Caledonia/20/99 y A/WSN/33; y cepas H3N2 A/California/07/2004, A/New York/55/04, y A/Udom/72. Por el contrario, un péptido de control que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, una versión desordenada de F3, no inhibió la hemaglutinación a ninguna concentración.

Concentraciones más altas de virus pueden superar la inhibición de hemaglutinación, lo que sugiere un mecanismo estocástico. El resultado con este ensayo tradicional de unión de virus con célula sugiere que los péptidos de la invención interactúan directamente con viriones para inhibir la unión con células. Por el contrario, el fármaco anti HFV FUZEON® interactúa con un producto intermedio de fusión de vida corta y no con una estructura de virión (Debnath, 2006; Platt, Durnin, y Kabat, 2005). La interacción directa con estructuras de virión nativas puede explicar, al menos en parte, la muy alta fuerza de F3 y F1 (aproximadamente 200 pM para placas de tamaño normal) en relación con el fármaco anti VIH FUZEON® (de 4 a 280 nM dependiendo de la cepa de VIH-1) en ensayos de infectividad de virus. Las miniplacas analizadas anteriormente pueden haber resultado del replegamiento de HA en el virión.

Se ha sugerido previamente que el replegamiento de HA se produce después de la exposición a un inhibidor de molécula pequeña del virus de la gripe A, que se sabe que interactúa con HA (Cianci, *et al.*, 1999; Luo, Colonna, y Krystal, 1996; Luo *et al.*, 1997). Este inhibidor de entrada y otros (Hoffman *et al.*, 1997) fueron avances bastante significativos al finales de 1990, ya que identificaron HA como una diana terapéutica importante. Sin embargo, hasta ahora, dichos inhibidores de molécula pequeña no se han desarrollado como fármacos gripales, más probablemente debido a su eficacia relativamente baja, con una Cl_{50} en el intervalo de concentración µM de bajo a medio. Un consenso en evolución en el campo creciente de inhibidores de la entrada viral es que los fármacos de molécula pequeña pueden no ser capaces de interferir eficazmente con las transiciones estructurales proteicas extensivas y múltiples interacciones intramoleculares que HA, y otras proteínas de fusión virales, experimentan durante el proceso de entrada viral.

Un modelo de trabajo para el proceso de fusión de célula - virión de virus de la gripe puede extrapolarse de trabajos intensos sobre virus de la gripe y otros virus de ARN durante muchas décadas. En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de dicho modelo. Aunque aún es hipotético en algunos aspectos, este modelo puede destacar la importancia de los motivos estructurales/funcionales de las glucoproteínas de virus de la gripe A que pueden actuar como dianas de desarrollo de fármacos. En la Figura 5, el Panel A muestra la unión de la proteína hemaglutinina 1 de la gripe (HA1) con el receptor celular, que consiste en sialolípidos o en sialoproteínas. El panel B muestra la entrada del virión de la gripe en la vesícula endocítica. Una proteína de virus de la gripe, conocida como viroporina M2, reduce el pH para desencadenar el reordenamiento de los dominios helicoidales de la proteína HA2. La secuencia de la proteína HA2 correspondiente a la secuencia de aminoácidos de F3 (SEQ ID NO: 3) se localiza al lado de una secuencia "resorte" metastabilizable. El reordenamiento permite que la parte del péptido de fusión de la proteína HA2 interactúe con la membrana de la vesícula. Los Paneles C y D ilustran HA2 "que salta hacia atrás" por un mecanismo de "correa en surco", poniendo a las membranas viral y celular en estrecha proximidad. Para mayor claridad, no se muestran HA1 y los sialorreceptores en los Paneles C-E. El panel C muestra un mecanismo alternativo en el que las secuencias de HA2, que forman una pista con la capacidad de formar interfaz con membranas de bicapas, pueden facilitar la mezcla de membranas celulares y virales. El Panel E muestra la formación del "poro de fusión" y la entrada de segmentos ribonucleoprotéicos del virus en la célula.

Estudios con animales vivos

El hurón se considera en general el mejor modelo para infección por virus de la gripe de seres humanos (Govorkova *et al.*, 2005; Hampson, 2006; Maher y DeStefano, 2004; van Riel *et al.*, 2007). De hecho, las directrices de la Unión Europea para eficacia de vacuna de la gripe requieren específicamente ensayar en el modelo de hurón. Pueden infectarse ratones y otros mamíferos pequeños con cepas humanas de virus de la gripe A, pero esto requiere típicamente, en el caso de cepas estacionales, la adaptación del virus para el nuevo hospedador. Por el contrario, los hurones pueden infectarse con la mayoría de las cepas de los virus de la gripe A humanas sin adaptación. La

distribución y patogénesis tisular de los virus de gripe A adaptados en ratones es distinta de la que se produce en la enfermedad humana (Lu *et al.*, 1999). La patogénesis de la infección por virus de gripe A en hurones es muy similar a la observada en seres humanos. Cuando los hurones se inoculan experimentalmente por vía intranasal, se produce replicación local del virus en el tracto respiratorio superior. La distribución de los receptores de ácido siálico en el tracto respiratorio de los hurones es similar a la de los seres humanos (van Riel *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2007).

De una manera sorprendentemente similar a los seres humanos con la gripe, los hurones desarrollan actividad reducida, fiebre, inapetencia, secreción nasal, estornudos, disnea, diarrea, secreción conjuntival y señales neurológicas. El hallazgo patológico predominante tanto en hurones como en seres humanos es la descamación del epitelio respiratorio ciliado y la infiltración de la submucosa de la cavidad nasal con células inflamatorias de infiltración. En un periodo de 48 horas después de la infección de un hurón por el virus de la gripe, se produce la destrucción casi completa del epitelio respiratorio nasal, dejando solamente la membrana basal.

La distinción principal entre la gripe en hurones y seres humanos es el periodo de tiempo en el que se presentan los síntomas de la enfermedad. Los hurones comienzan a desarrollar los síntomas de gripe antes de un día después de la infección, pero a los 4 días después de la infección se han resuelto la mayoría de los hallazgos bien conocidos (actividad reducida, fiebre, inapetencia, secreción nasal, estornudos, etc.). Debería observarse que muchas cepas del virus de la gripe A humana son capaces de infectar el tracto respiratorio inferior de hurones a diversos grados. Como en seres humanos, las cepas altamente patógenas del virus de la gripe A, son capaces de propagarse en hurones desde el tracto respiratorio superior al cerebro o desde el tracto respiratorio inferior a la circulación y a otros órganos. Las cepas de H5N1 actuales de virus de la gripe A aviar pueden establecer infecciones letales en hurones (Govorkova *et al.*, 2005; Thiry *et al.*, 2007; Vahlenkamp y Harder, 2006).

Los estudios *in vitro* iniciales se centraron en cepas de laboratorio bien caracterizadas de virus de la gripe A correspondientes a subtipos actualmente en circulación en seres humanos incluyendo, A/WSN/33 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1) y A/Udom/72 (H3N2). Los péptidos F3 y F1 mostraron eficacia similar en ensayos de reducción de placas frente a diversas otras cepas de virus de gripe A, incluyendo aislados clínicos de las cepas H1N1 (A/New Caledonia/20/99) y H3N2 (A/NY/55/04; A/Cal/07/04), que no se han evaluado exhaustivamente en el laboratorio. Estudios con aislados clínicos recientes, tales como estos, son importantes para establecer la eficacia de los agentes terapéuticos con virus que provocan actualmente gripe en seres humanos. Cabe destacar que, estas cepas también causan gripe en hurones que crecen hasta altos títulos en los cornetes nasales y en los pulmones de esta especie después de inoculación intranasal.

Para todos los estudios, se propagaron aislados de virus en huevos de pollo embrionados (obtenidos en Charles River Laboratories o Louisiana State University Poultry Sciences Department) usando procedimientos convencionales. Se recogieron fluidos alantoides de huevos de 11 días de vida un día después de la inoculación, y se examinaron grupos de virus con respecto a la actividad de hemaglutinación frente a glóbulos rojos de pavo (tRBC, *turkey red blood cells*) (Lampire Laboratories, USA) usando procedimientos convencionales. Se valoraron grupos de hemaglutinación positivos (> 256 unidades de HA) por ensayo en placa viral, como se ha descrito anteriormente, y se conservaron en nitrógeno líquido hasta que se usaron para estudios de exposición. Los péptidos se prepararon en tampón de fosfato y las soluciones tamponadas se aplicaron directamente a las fosas nasales de hurones anestesiados usando una pipeta (vía de administración intranasal).

Estudio de exposición 1

Los hurones se trataron previamente con F3 o con una versión de control desordenada del péptido (SEQ ID NO: 14), durante dos días antes de la exposición al virus (Día -2 y día -1) a una dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg por vía intranasal, una vez al día o dos veces al día. Doce horas después del último tratamiento, los animales se infectaron por inoculación intranasal con aproximadamente 105 ufp de la cepa de gripe H3N2 A/Cal/07/04, que es al menos 100 veces la dosis mínima infecciosa como se determina en estudios de hallazgos de dosis infecciosa. Los péptidos se volvieron a administrar a los hurones a la dosis de 0,3 mg/kg aproximadamente 12 horas después el Día 0, así como el Día 1 y Día 2 después de la exposición viral. El Día 2, todos los hurones tratados con el péptido de control desordenado habían desarrollado dificultad respiratoria significativa (respiración superficial rápida (respiración superficial rápida), fiebre alta y estornudos. Por el contrario, ninguno de los animales tratados con F3 tuvo dificultad respiratoria grave, aunque un subconjunto (2/5 en el grupo de predosificación dos veces al día, 1/6 en el grupo de predosificación una vez al día) mostró algunas señales respiratorias muy leves con fiebre ligera. El Día 3, ninguno de los hurones tratados con F3 mostró señales clínicas de gripe, mientras que el 50 % de los hurones tratados con el péptido de control desordenado aún presentaban letargo, y el 100 % de los hurones tratados con péptido de control desordenado presentaron secreción nasal significativa. Claramente F3 proporcionaba un beneficio de tratamiento significativo y sorprendentemente eficaz en este experimento de exposición inicial.

Estudio de exposición 2

En un segundo estudio de exposición, se incluyeron 12 hurones en el grupo de tratamiento F3 y se incluyeron 12 hurones en el grupo de péptido de control. Los animales se infectaron con aproximadamente 105 ufp de gripe A/Cal/07/04; sin embargo, en este estudio los hurones se trataron con 0,3 mg/kg de F3 o péptido de control cuatro

horas después de la exposición viral el Día 0, sin tratamientos de exposición previral. El Día 2, los 12 hurones que se trataron con el péptido de control desordenado habían desarrollado dificultad respiratoria significativa, fiebre alta y estornudos. Por el contrario, ninguno de los animales tratados con F3 tuvo ninguna señal de dificultad respiratoria u otras señales de gripe en este momento. La Figura 6 muestra las respuestas patológicas observadas en los hurones durante el estudio, obtenidas supervisando la dificultad respiratoria (Panel A), la secreción nasal (Panel B) y la actividad (Panel C) para ambos grupos de tratamiento durante el periodo de estudio en vivo.

Como se indica en la Figura 6, los animales tratados con F3 mostraron respuestas patológicas significativamente reducidas en relación con el grupo de control. Solamente dos animales del grupo tratado con F3 desarrollaron señales leves de gripe y esto se produjo el Día 4 del experimento, dos días después de haberse detenido el tratamiento con el péptido. Además de parámetros clínicos, se recogieron aspirados nasales y tejidos pulmonares y extrapulmonares a intervalos diarios a lo largo del periodo de estudio para análisis del título de virus, patología macroscópica e histopatología. Los animales que se trataron con F3 mostraron presentaciones de pulmones normales. Por el contrario, los hurones tratados con el péptido de control mostraron pruebas de inflamación. Los tejidos de hurones tratados con F3 mostraron patología notablemente reducida en comparación con animales tratados con péptido de control, mostrando los hurones tratados con péptido de control infiltraciones, inflamación bronquial, con exudados bronquiales característicos de una infección de gripe.

El análisis de RT-PCR cuantitativa y cebadores conservados para el gen de la nucleoproteína del virus de la gripe, proporciona análisis fiables de niveles de ARN genómicos virales en homogeneizados tisulares de hurones tratados e infectados. Se recogieron muestras de aspirados nasales de los animales durante el periodo de estudio. Los títulos de virus de esas muestras se muestran en la Figura 7, Panel A. Los resultados de los análisis de homogeneizados de tejidos de hurón extraídos del cerebro, tráquea, hígado, bazo y sangre el Día 1 del estudio se muestran en el Panel B de la Figura 7. Los datos del Panel A demuestran que los títulos máximos de virus de la gripe en lavados nasales de hurones se redujeron en más de $2,0 \log_{10}$ y en los pulmones en más de $6,0 \log_{10}$. Estos resultados indican que F3 redujo significativamente la replicación de virus de la gripe en el tracto respiratorio superior de hurones. Los datos del Panel B indican que F3 bloqueó eficazmente la propagación del virus al tracto respiratorio inferior y también a otros órganos.

Identificación de la región de inicio de fusión, RIF, de la gripe

El extremo carboxilo de la RIF de un virus de la gripe puede definirse como el resto inmediatamente precedente a la primera secuencia peptídica que muestra una hidrofobicidad interfacial positivamente creciente en una representación de hidropatía interfacial de Wimley-White que se encuentra más allá del extremo carboxilo de la hélice N (resto 104). La Tabla 3 posterior muestra la escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White para proteínas en interfaces de membrana como describen Wimley y White en 1996. Esta escala de hidrofobicidad o hidropatía se basa en el cambio de energía libre requerido para transferir un resto peptídico de una interfaz de bicapa de membrana hidrófoba a una fase acuosa. En esta escala, una energía libre positiva (ΔG), en kilocalorías por mol, indica un resto más hidrófobo (es decir, debe añadirse energía para transferir un resto hidrófobo desde una membrana hidrófoba en agua. De forma similar, una energía libre negativa indica un resto más hidrófilo.

En una representación de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White, la RIF se caracteriza como una región pico de hidropatía (es decir, una región de hidrofobicidad relativamente más grande que incluye un máximo local en hidrofobicidad situado entre dos mínimos locales en hidrofobicidad. Esta región pico comienza en la hélice N de la proteína HA2 y termina a una distancia de aproximadamente 15 restos más allá de la hélice N.

Tabla 3: Escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White

Resto X	pH	ΔG (kcal mol ⁻¹)
Ala	8	-0,17 ± 0,06
Arg	2	-0,81 ± 0,11
Asn	8	-0,42 ± 0,06
Asp	8	-1,23 ± 0,07
Asp	2	0,07 ± 0,11
Cys	8	0,24 ± 0,06
Gln	8	-0,58 ± 0,08
Glu	8	-2,02 ± 0,11
Glu	2	0,01 ± 0,15
Gly	8	-0,01 ± 0,05
His	8	-0,17 ± 0,06
His	2	-0,96 ± 0,12
Ile	8	0,31 ± 0,06
Leu	8	0,56 ± 0,04

Resto X	pH	ΔG (kcal mol ⁻¹)
Lys	2	-0,99 ± 0,11
Met	8	0,23 ± 0,06
Phe	8	1,13 ± 0,05
Pro	8	-0,45 ± 0,12
Ser	8	-0,13 ± 0,08
Thr	8	-0,14 ± 0,06
Trp	8	1,85 ± 0,06
Tyr	8	0,94 ± 0,06
Val	8	-0,07 ± 0,05

Para calcular un perfil de hidropatía interfacial para una proteína o un polipéptido pueden usarse programas informáticos, tales como el explorador de proteínas de membrana (MPEx) disponible en el sitio web: blanco.biomol.uci.edu/mpex. El programa MPEx incorpora escalas de hidropatía de Wimley-White y constituye un método preferido para determinar el grado de hidrofobicidad interfacial de estas secuencias peptídicas. El programa informático MPEx se usó para ayudar a la caracterización del extremo carboxilo de la RIF en cada una de las trece variantes de HA2 secuenciadas mostradas en la Figura 2. El programa informático MPEx representa la puntuación de hidropatía interfacial de Wimley-White para la proteína o el péptido de interés promediando los valores de hidropatía de restos completos para todos los restos en una ventana que consiste en un número fijo de restos de aminoácidos consecutivos (preferentemente aproximadamente 19 restos) y representando el valor promedio de la hidropatía en esa ventana como la puntuación de hidropatía para el resto medio en la ventana. La ventana se desplaza después en un resto moviendo desde la dirección amino terminal a la carboxilo terminal, y el proceso se repite hasta que se ha determinado la puntuación de hidropatía para cada resto en la región de interés.

Se prepararon perfiles de hidropatía interfacial de Wimley-White para los 13 subtipos HA2 mostrados en la Figura 2 usando el programa MPEx, usando una ventana de 19 restos de aminoácidos. El extremo amino de la RIF se encuentra en el punto dentro de la hélice N de la proteína en el que la hidropatía interfacial comienza a aumentar de forma continua después de un mínimo local (es decir, en el resto 77 para todas las proteínas HA2 examinadas hasta la fecha). El extremo carboxilo de la RIF es el resto inmediatamente precedente al primer mínimo local en hidrofobicidad más allá de la hélice N, es decir, el resto inmediatamente antes de la primera secuencia peptídica con hidrofobicidad interfacial positivamente creciente que se encuentra más allá del extremo carboxilo de la hélice N. En cada subtipo de HA2 de gripe A mostrado en la Figura 2, la hélice N termina en el resto 104. No es necesario que la representación de las puntuaciones de hidropatía interfacial de Wimley-White cruce por encima del eje cero para ser útil en la determinación de la localización del extremo carboxilo de una RIF, únicamente tiene que haber un aumento en la puntuación de hidropatía en relación con los restos peptídicos precedentes.

Las Figuras 8-20 muestran los perfiles de hidropatía de Wimley-White de MPEx de las trece variantes secuenciadas de la proteína de fusión HA2 de gripe A (en estas Figuras, "A" indica la RIF del péptido, caracterizada por un pico en la representación de hidropatía). El extremo carboxilo de la RIF se indica en cada una de las Figuras 8-20 con una "B". A partir de los análisis, se ha determinado que el extremo amino de la RIF comienza en el resto 77 de la secuencia de HA2, en cada subtipo de HA2 viral. El extremo carboxilo de la RIF varía entre el resto 110 y el 119 para cada uno de los subtipos de HA2. En la Figura 2 la región RIF se destaca dentro de un borde oscurecido alrededor de los restos 77 a 110 o 119.

Los péptidos de la divulgación que tienen actividad mejorada puede identificarse preparando conjuntos de péptidos anidados, que son más largos (correspondientes a secuencias flanqueantes de HA) o están truncados en comparación con una parte de proteína inhibidora diana activa de una RIF (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). Los péptidos que extienden la secuencia de aminoácidos de HA diana en 3-6 aminoácidos en los extremos amino o carboxilo de los péptidos se ensayan sistemáticamente frente a una batería de virus de la gripe para determinar si los segmentos de aminoácidos en uno de los lados de la secuencia contribuyen a una inhibición de infectividad aumentada. Si un péptido que es más largo que la secuencia diana, inhibe la infectividad del virus de gripe A con una CI₅₀ menor que la de la diana, entonces los péptidos que tienen menos aminoácidos adicionales que la diana pueden ensayarse sistemáticamente para determinar el péptido mínimo con actividad inhibidora de infectividad. Los péptidos activos específicos para un tipo o subtipo particular también pueden ensayarse frente a varias cepas adicionales del mismo tipo o subtipo de virus de la gripe para determinar la amplitud de la actividad inhibidora. Por ejemplo, un péptido diana basado en SEQ ID NO: 5 debería inhibir múltiples virus de subtipos H5 con una CI₅₀ < 100 nM.

Otras variantes peptídicas adecuadas para ensayo pueden determinarse alterando sistemáticamente restos en la secuencia diana a restos de alanina (denominado en el presente documento "exploración de alanina"). La comparación de los péptidos modificados con alanina con péptidos de tipo silvestre identifica restos importantes para la inhibición de la fusión/infectividad. Si más de un aminoácido afecta a la inhibición, pueden sintetizarse péptidos adicionales con alteraciones en cada resto importante.

Los dominios funcionales supuestamente dirigidos por péptidos de la invención (por ejemplo, SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 13) tienen configuración alfa helicoidal. Las variaciones peptídicas que mejoran o alteran la helicidad pueden alterar la actividad de los péptidos como inhibidores de fusión/infectividad de virus de la gripe A. En consecuencia, pueden prepararse variantes o análogos de péptidos activos sustituyendo aminoácidos que favorecen el contenido helicoidal, tales como aminobutirato (AIB) o ácido glutámico por otros aminoácidos. De forma similar, la adición de prolinas o glicinas a un péptido puede alterar el contenido alfa helicoidal, que mejorará o reducirá la actividad inhibidora desde un punto de vista informativo. También pueden ensayarse péptidos análogos adicionales con unión aumentada a HA2 identificados explorando bibliotecas combinatorias con respecto a la inhibición de la infectividad de virus de la gripe.

En la cavidad nasal o en el pulmón, las peptidasas podrían limitar posiblemente la utilidad de agentes terapéuticos de plataforma *in vivo*. Si una variante peptídica, que está activa en ensayos de reducción en placas, se degrada o se elimina rápidamente de los tejidos respiratorios, pueden realizarse modificaciones adicionales para aumentar la estabilidad y conservación de péptidos. Polvo seco o alteraciones/adiciones en la formulación pueden mejorar la estabilidad de los péptidos. Análogos peptídicos ciclados, con dos cisteínas más añadidas para proporcionar un péptido ciclado de disulfuro, pueden estabilizar estructuras secundarias y hacer al péptido más resistente a degradación. La sustitución de dos o más restos con prolina también puede aumentar en gran medida la estabilidad de péptidos sintéticos. Diversas modificaciones amino o carboxilo terminales o conjugación con proteínas (por ejemplo, seroalbumina) o lípidos (por ejemplo, ácido mirístico) también pueden mejorar la estabilidad de la actividad de péptidos inhibidores virales (Qureshi *et al*, 1990), como también la introducción de aminoácidos no naturales (hidroxiprolina o D-aminoácidos) en sitios de escisión de peptidasa.

En el caso de que los péptidos inhibidores demuestren baja solubilidad en soluciones acuosas, pueden sintetizarse variantes peptídicas con una variación de secuencia ASKSKSK (SEQ ID NO: 15) añadida al extremo carboxilo para aumentar la solubilidad del péptido. Se ha mostrado que esta secuencia aumenta la solubilidad de los péptidos modélicos, conservando al mismo tiempo la estructura secundaria. La solubilidad aumentada también puede reducir la concentración requerida para inhibir la fusión mediada por la envoltura del virus de la gripe.

Secuencias de restos conservados

Se ha observado que una secuencia altamente conservada YNAELL (SEQ ID NO: 1), queda dentro de las RIF de once de los trece subtipos de HA2 secuenciados y que la secuencia correspondiente YNAKLL (SEQ ID NO: 16), que muestra una única sustitución de aminoácido en SEQ ID NO: 1, aparece en los otros dos subtipos. Solamente otra secuencia dentro de las trece variantes de HA2 secuenciadas está más altamente conservada que YNAELL (SEQ ID NO: 1). Esta secuencia, AIAGFIE (SEQ ID NO: 31, restos 5-11 de la proteína de longitud completa), queda dentro del péptido de fusión, o PF, de la proteína HA2. El dominio del PF es uno de los cinco dominios previamente conocidos de proteínas de fusión viral de Clase I, y se ha sabido previamente que el dominio del PF desempeña un papel importante en el proceso de fusión de virus con célula.

El uso de los términos “un”, “uno/a”, “el” y “la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse que incluye tanto el singular como el plural, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significan “incluyendo, pero sin limitación”) a no ser que se indique de otro modo. Se pretende únicamente que la enumeración de intervalos de valores en el presente documento sirva como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor distinto que queda dentro del intervalo, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor distinto se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a no ser que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, pretende únicamente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación sobre el alcance de la invención a no ser que se reivindique otra cosa. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debería interpretarse como indicador de que ningún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de la presente invención, incluyendo el mejor modo conocido por los autores de la invención para llevar a cabo la misma. Tras la lectura de la descripción anterior, pueden resultar obvias, para los expertos en la materia, variaciones de esas realizaciones preferidas. Los autores de la invención esperan que los expertos en la materia empleen las variaciones según sea apropiado.

Referencias

Cada una de las siguientes referencias se incorpora por referencia en su totalidad:

Chang, D.K., y su, C.S. (2007). Biophysical evidence of two docking sites fo the carboxyl heptad repeat region conin the amino heptad repeat region of gp41 of immunodeficiency virus type 1. *Antiviral. Res.* 74, 51-8.

- Cianci, C., Yu, K.L., Dischino, D.D., Harte, W., Deshpande, M. Luo, G., Colonno, R.J., Meanwell, N.A., y Krystal, M. (1999). PH-dependent change in photoaffinity labeling patterns of the H1 influenza virus hemagglutinin by using an inhibitor of viral fusion. *J. Virol.* 73, 1785-94.
- 5 Debnath, A.K. (2006). Prospects and strategies for the discovery and development of small-molecule inhibitors of six-helix bundle formation in class 1 viral fusion proteins. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 7, 118-27.
- Este, J.A., y Telenti, A. (2007). HIV entry inhibitors. *Lancet* 370, 81-8.
- Govorkova, E.A., Rehg, J.E., Krauss, S., Yen, H.L., Guan, Y., Peiris, M., Nguyen, T.D., Hanh, T.H., Puthavathana, P., Long, H.T., Buranathai, C., Lim, W., Webster, R.G., y Hoffman, E. (2005). Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J. Virol.* 79, 2191-8.
- 10 Hampson, A.W. (2006). Ferrets and the challenges of H5N1 vaccine formulation. *J. Infect. Dis.* 194, 143-5.
- Hoffman, L.R., Kuntz, I.D., y White, J.M. (1997). Structure-based identification of an inducer of the low-pH conformational change in the influenza virus hemagglutinin: irreversible inhibition of infectivity. *J. Virol.* 71, 8808-20.
- Lu, X., Tumpey, T.M., Morken, T., Zaki, S.R., Cox, N.J., y Katz, J.M. (1999). A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J. Virol.* 73, 5903-11.
- 15 Luo, G., Colonno, R., y Krystal, M. (1996). Characterization of a hemagglutinin-specific inhibitor of Virus de la gripe A. *Virology* 226, 66-76.
- Luo G., Torri, A., Hare, W.E., Danetz, S., Cianci, C., Tiley, L., Day, S., Mullaney, D., Yu, K.L., Ouellet, C., Dextraze, P., Meanwell, N., Colonno, R. y Krystal, M. (1997). Molecular mechanism underlying the action of a novel fusion inhibitor of Virus de la gripe A. *J. Virol.* 71, 4062-70.
- 20 Maher, J.A. y DeStefano, J. (2004). The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab. Anim. (NY)* 33, 50-3.
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., y Klenk, H. (2006). New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *J. Virol.* 3, 63.
- Platt, E.J., Dumin, J.P., y Kabat, D. (2005). Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 79, 4347-56.
- 25 Qureshi, N., Coy, D., Garry, R., y La, H. (1990). Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS* 4, 553-558.
- Thiry, E., Zicola, A., Addie, D., Egberink, H., Hartmann, K., Lutz, H., Poulet, H., y Horzinek, M.C. (2007). Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus, in cats and other carnivores. *Vet. Microbiol.* 122, 25-31.
- Vahlenkamp, t.W., y Harder, T.C. (2006). Influenza virus infections in mammals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 119, 123-31.
- 30 van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., y Kuiken, T. (2006). H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science* 312, 399.
- van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., y Kuiken, T. (2007). Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am. J. Pathol.* 171, 1215-23.
- 35 Wimley, W.C., White, S.H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Struct. Biol.* 3(10), 842-848.
- Yen, H.L., Lipatov, A.S., Ilyushina, N.A., Govorkova, E.A., Franks, J., Yilmaz, N., Douglas, A., Hay, A., Krauss, S., Rehg, J.E., Hoffman, E., y Webster, R.G. (2007). Inefficient transmission of H5N1 influenza viruses in a ferret contact model. *J. Virol.* 81, 6890-8.
- 40 Zhu, J., Jiang, X., Lui, Y., Tien, P., y Gao, G.F. (2005). Design and characterization of viral polypeptide inhibitors targeting Newcastle disease virus fusion. *J. Mol. Biol.* 354, 601-13.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> GARRY, Robert F.
WILSON, Russell B.
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA GRIPE
- 50 <130> TU-271.2 2
- <150> US 60/937,120
<151> 25-06-2007
- 55 <150> US 10/578,013
<151> 03-11-2004
- <150> US 60/517,181
<151> 04-11-2003
- 60 <160>31
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 65 <211> 6
<212> PRT

ES 2 581 381 T3

5 <213> Virus de la gripe A
 <220>
 <223> Restos 94-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H3
 <400> 1

Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5

10 <210> 2
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

15 <220>
 <223> Restos 72-116 de hemaglutinina 2 de gripe A/H3
 <400> 2

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
 1 5 10 15
 Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
 20 25 30
 Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser
 35 40

20 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

25 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H3, A/H4 y A/H14
 <400> 3

Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

35 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

40 <220>
 <223> Restos 84-102 de hemaglutinina 2 de gripe A/H1
 <400> 4

Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Leu

45 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

50 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H5

ES 2 581 381 T3

<400> 5

Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

5 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

10 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H7

<400> 6

15 Thr Arg Asp Ala Met Thr Glu Val Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Virus de la gripe A

<220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H9

25 <400> 7

Val Asp Asp Gln Ile Gln Asp Ile Trp Ala Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

30 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Influenza B virus

35 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe B

<400> 8

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

40 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

45 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H2 y A/H6

<400> 9

50 Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

55 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

<220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H10

ES 2 581 381 T3

<400> 10

Thr Lys Asp Ser Ile Thr Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

5 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

10 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H13
 <400> 11

Ile Asp Asp Ala Val Thr Asp Ile Trp Ser Tyr Asn Ala Lys Leu Leu
 1 5 10 15

15 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

20 <220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H15

<400> 12

25 Thr Arg Asp Ser Leu Thr Glu Ile Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 1 5 10 15

30 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

<220>
 <223> Restos 84-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H16

35 <400> 13

Val Asp Asp Ala Val Thr Asp Ile Trp Ser Tyr Asn Ala Lys Leu Leu
 1 5 10 15

40 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Versión desordenada de restos 84-99 de HA 2 de gripe A/H3
 <223> Péptido sintético

<400> 14

50 Ser Trp Leu Val Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asp Asp Glu Val Glu Leu
 1 5 10 15

55 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 581 381 T3

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 15

5

Thr Arg Asp Ser Leu Thr Glu Ile Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
1 5 10 15

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

10

<220>
<223> Restos 94-99 de hemaglutinina 2 de gripe A/H13 y A/H16

15

<400> 16

Tyr Asn Ala Lys Leu Leu
1 5

20

<210> 17
<211> 222
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

25

<220>
<223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H1

<400> 17

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly
1 5 10 15
Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser
20 25 30
Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile
35 40 45
Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr
50 55 60
Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu
65 70 75 80
Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala
85 90 95
Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp
100 105 110
Leu Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn
115 120 125
Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys
130 135 140
Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro
145 150 155 160
Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val
165 170 175
Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr

180 185 190
Val Ala Ser Leu Val Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe
195 200 205
Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
210 215 220

30

<210> 18
<211> 222
<212> PRT

<213> Virus de la gripe A

<220>

<223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H2

5

<400> 18

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

10

<210> 19

<211> 221

<212> PRT

<213> Virus de la gripe A

15

<220>

<223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H3

<400> 19

Gly	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly
1				5					10					15	
Met	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr
			20					25					30		
Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile
		35					40					45			
Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Val	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His
	50					55					60				
Gln	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu
65					70					75					80
Glu	Lys	Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala
				85					90					95	
Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp
			100					105					110		

20

ES 2 581 381 T3

Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu
 115 120
 Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
 130 135 140
 Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp
 145 150 155 160
 Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
 165 170 175
 Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
 180 185 190
 Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
 195 200 205
 Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 210 215 220

5 <210> 20
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

10 <220>
 <223> Hemagglutinina 2 de gripe A/H4

<400> 20

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

15 <210> 21
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

20 <220>
 <223> Hemagglutinina 2 de gripe A/H5

<400> 21

ES 2 581 381 T3

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly
 1 5 10 15
 Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val

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

- <210> 22
- <211> 222
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la gripe A
- <220>
- 10 <223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H6
- <400> 22

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

<210> 23
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

5

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H7

10

<400> 23

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

ES 2 581 381 T3

<210> 24
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

5

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H9

<400> 24

10

```

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

Trp Ala Met Ser Asn Gly Ser Cys Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 210     215     220
    
```

<210> 25
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

15

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H10

20

<400> 25

ES 2 581 381 T3

Gly 1 Leu Phe Gly Ala 5 Ile Ala Gly Phe Ile 10 Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 Met val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg 25 His Gln Asn Ala Gln Gly Thr
 Gly Gln Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile
 Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Thr Glu Phe Glu
 Ser Ile Glu Ser Glu Phe Ser Glu Thr Glu His Gln Ile Gly Asn Val
 65 Ile Asn Trp Thr Lys Asp Ser Ile Thr Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala
 85 Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Met Ala Asp
 100 Ser Glu Met Leu Asn Leu Tyr Glu Arg Val Arg Lys Gln Leu Arg Gln
 115 Asn Ala Glu Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Ile Tyr His Thr Cys
 130 Asp Asp Ser Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr Asp His Ser
 145 Gln Tyr Arg Glu Glu Ala Leu Leu Asn Arg Leu Asn Ile Asn Pro Val
 165 Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Ile Ile Leu Trp Phe Ser Phe Gly
 180 Glu Ser Cys Phe Val Leu Leu Ala Val Val Met Gly Leu Val Phe Phe
 195 Cys Leu Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile
 210 215 220

<210> 26
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

5

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 de la gripe A/H13

10

<400> 26

ES 2 581 381 T3

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

130 135 140
 Asn Asp Ser Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Thr
 145 150 155 160
 Glu Tyr Ala Glu Glu Ser Lys Leu Lys Arg Gln Glu Ile Asp Gly Ile
 165 170 175
 Lys Leu Lys Ser Glu Asp Asn Val Tyr Lys Ala Leu Ser Ile Tyr Ser
 180 185 190
 Cys Ile Ala Ser Ser Val Val Leu Val Gly Leu Ile Leu Ser Phe Ile
 195 200 205
 Met Trp Ala Cys Ser Ser Gly Asn Cys Arg Phe Asn Val Cys Ile
 210 215 220

<210> 27
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 de la gripe A/H14

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

5

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 de gripe A/H15

10

<400> 28

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

ES 2 581 381 T3

<210> 29
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

5

<220>
 <223> Hemaglutinina de gripe A/H16

<400> 29

10

```

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

<210> 30
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Virus 8 de gripe

15

<220>
 <223> Hemaglutinina 2 del virus 8 de gripe

20

<400> 30

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

<210> 31

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Virus de la gripe A

<220>

10 <223> Restos 5-11 de hemaglutinina 2 de gripe A subtipos: H1-H7, H9, H10 y H13-H16

<400> 31

Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
 1 5

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado que, en cuanto a su secuencia de aminoácidos, consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 para su uso en un método de tratamiento de una infección por virus de la gripe.
2. El péptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye un sustituyente lipídico.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución salina tamponada.
- 15 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en la que la composición está en forma de un polvo inhalable.
- 20 6. Un péptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección por virus de la gripe es una infección por subtipo H1, H3 o H5 de gripe A.
7. Un péptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección por virus de la gripe es una infección por gripe B.
- 25 8. Un péptido aislado que, en cuanto a su secuencia de aminoácidos, consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 para su uso en la preparación de un medicamento para un método de tratamiento de una infección por virus de la gripe.
9. El péptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 que incluye un sustituyente lipídico.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o reivindicación 9 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución salina tamponada.
- 35 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la que la composición está en forma de un polvo inhalable.
- 40 13. Un péptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la infección por virus de la gripe es una infección por subtipo H1, H3 o H5 de gripe A.
14. Un péptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la infección por virus de la gripe es una infección por gripe B.

FIG. 1

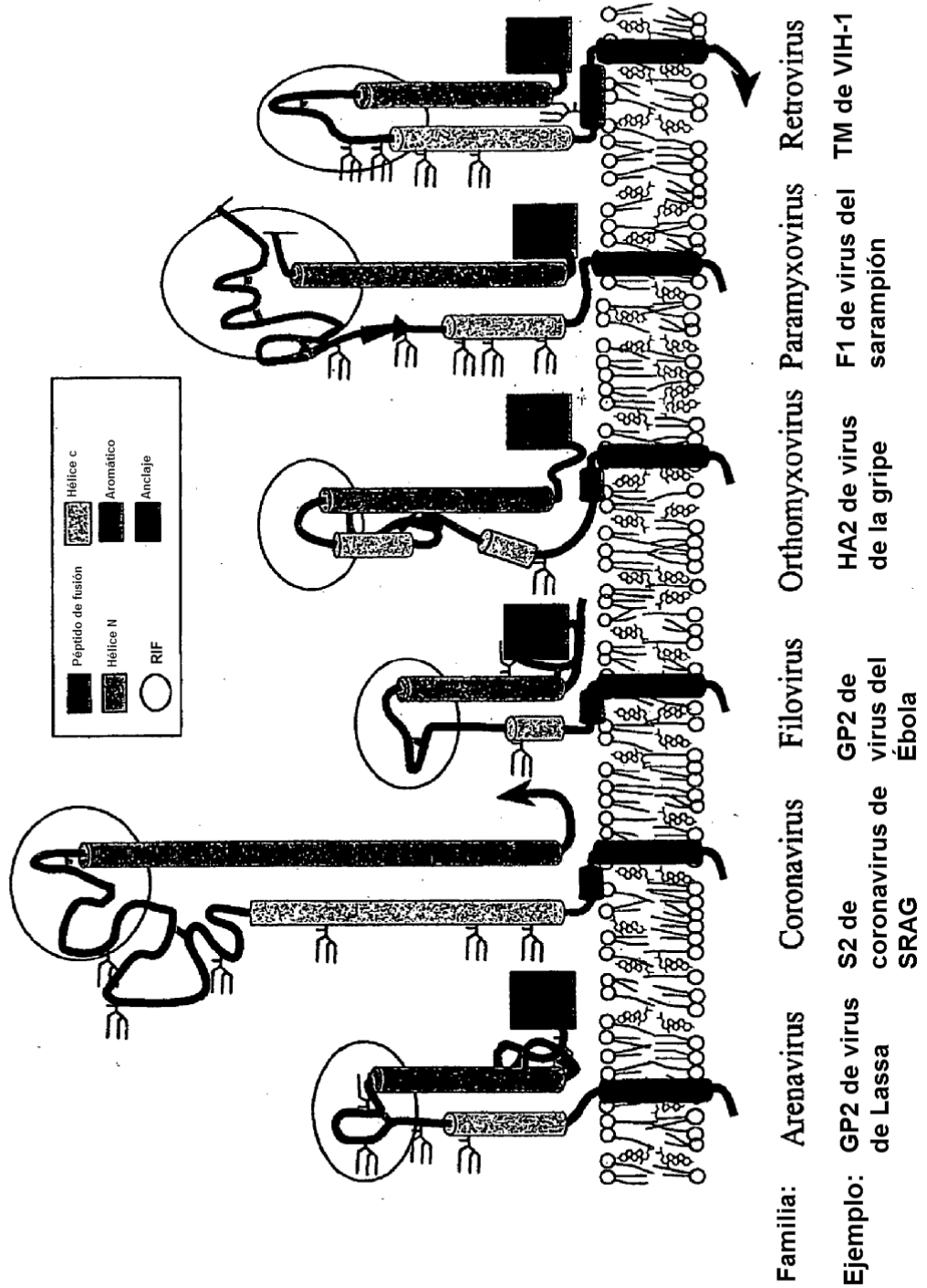


FIG. 2, Panel A

H1	1	G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	T	G	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	30
H2		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	Q	Q	M	V	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H3		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H4		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	Q	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H5		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	Q	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H6		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	Q	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H7		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H9		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H10		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H13		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H14		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H15		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H16		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
Consenso		G	L	F	G	A	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	E	Q	M	I	D	G	W	Y	G	H	H	Q	N	E	Q	
H1	40	G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H2		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H3		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H4		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H5		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H6		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H7		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H9		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H10		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H13		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H14		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H15		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
H16		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		
Consenso		G	S	G	Y	A	A	A	D	Q	K	S	T	Q	Q	A	I	N	G	I	T	N	S	V	I	E	K	M	N	60		

FIG. 2, Panel C

H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H9 H10 H13 H14 H15 H16 Consenso
 130
 K K K R K K R R Q R R Q R R Q
 V V T V V V V V V V V V V V
 K R R R R L S R R K R R R R R R
 S M R R R Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
 Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
 L L L L L L L L L L L L L L L
 K R R R R R R G R K R R R R R
 N D E E N A A E S N A A E E N A
 N N N A A A A A A A A A A A A
 A V A A A A A A A A A A A A
 140
 E E D D E D E E E E E D D E Q D E
 I L M K L L G G T K K N G T G G G
 G N G G G G G G G G G G G G G
 C C C C C C C C C C C C C C C
 F F F F F F F F F F F F F F F
 E E K E E E E E E L L F F L L
 150
 Y Y Y F Y W F Y L Y L F F L L
 H H H H H H H H H H H H H H
 K K K Q K K K K T K Q R K K
 C C C C C C C C C C C C C C C
 D D D D D D D D D D N D D D
 N D N N N E D Q S S N Q S
 E E A S E E D Q S S N Q S
 C C C C C C C C C C C C C C C
 M M I I M I M M M I M M M E

H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H9 H10 H13 H14 H15 H16 Consenso
 160
 S S I R R R S S V I I I S T S T S S T S
 V V I R R R S S V I I I I I I I I I
 R K R R R R R R R R R R R R R R R
 N N N G N G N G N G N G N G N G
 G G T T Y Y D D Y Y H H H H H H
 Y Y D D H Y Y H R R H H H H H H
 P P D D P P S R R S T E N T E
 K K V I Q K K K Q E I E D
 Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y
 S E R R S H R K R A R R R R R R
 E E D D E E E E E E E E E E E
 S S A A A A S A S A S A S A S A
 K K L I R K M R L L L N Q L
 N N R R R R R R R R R R R R R R
 170
 N R R R R R R R R R R R R R R R
 E N F F E Q I Q L Q I I Q
 K E Q Q E K Q K N E K I M E I
 I I I I I I I I I I I I I I I
 D K K Q N E D E N D N P P G G
 G G G G S P G P G P P P G G
 V V V D V V V V V V I V V I V
 K K E K K K K K K K T K K K
 L L L L L L L L L L L L L L L
 E S S Q S N S S S S S S M S S S
 180
 S S S Q S N S S S S S S M S S S

FIG. 3**Hemagglutinina 2 de gripe B**

GFFGAIAGFL EGGWEGMIAG WHGYTSHGAH
 GVAVAADLKS TQEAINKITK NLNSLSELEV
 KNLQRLSGAM DELHNEILEL DEKVDDL RAD
 TISSQIELAV LLSNEGIINS EDEHLLALER
 KLKMLGPSA VDIGNGCFET KHKCNQTCLD
 RIAAGTFNAG EFSLPTFDSL NITAAASLNDD
 GLDNHTILLY YSTAASSLAV TLMIAIFIVY
 MVS RDNVSCS ICL

100 V V V V V V V V V V V V V V V V
 L L L L L L L L L L L L L L L L A L
 L L L L L L L L L L L L L L L L L L
 E E E E E E E E E E E K E E K E E
 A A A A A A A A A A A A A A I A
 N N N N N N N N N N N N N N Q N
 Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y S Y
 T T S S T T S A T S S S S S S
 W W W W W W W W W W W W W I W
 I V L L V V V I I W S S S S S
 90 D D D D D D D D D D D D D D D
 L L I I L L T Q T T I D D I D D D
 F F K K F F M I I V K L V R
 G G T T G G S Q S A T S A L
 D D D D D D D D D D D D D D D
 D E E E E R D K D E R D D D
 V M V V M M T I T I V T V V
 K K Y Y K R W K W R Y R K
 K K K K K N N N D K N D E
 N N E E N N I N I A E I A D
 80 L L L L L M V I V L L V L L L
 N N D D N N M N M D N M E
 E E Q Q E D G N G N Q G N L
 M L I I I I L I I I I I I
 R R R R R R Q R Q R Q R E R
 K R G R R R K T H K G Q K N
 E E E E E E E T E E E E H E
 L L V V L L V V T V V V E L V
 72 N N E Q N N E E E Q Q E Q E
 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H9 H10 H13 H14 H15 H16 HB Consenso

L S S S S A S A S A S A E S
 D D D D D D D D D D D D D
 H H T T H H A H A H T A H E
 110 F F L V F L L E M M V L L S
 D D D D D D D D D D D D N D
 L L I I L L I L L I L L I L L I
 T T T T T T T T T T T T I T
 R R H H R R H K H K H H R G
 E E Q Q E E Q Q D Q G E
 N N N N N N N N N N N N N
 E E E E E E E E E E S E
 L M L L M L L M L L M L L L L
 101 L L A A L L A L A L A L L L L
 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H9 H10 H13 H14 H15 H16 HB Consenso

FIG. 4

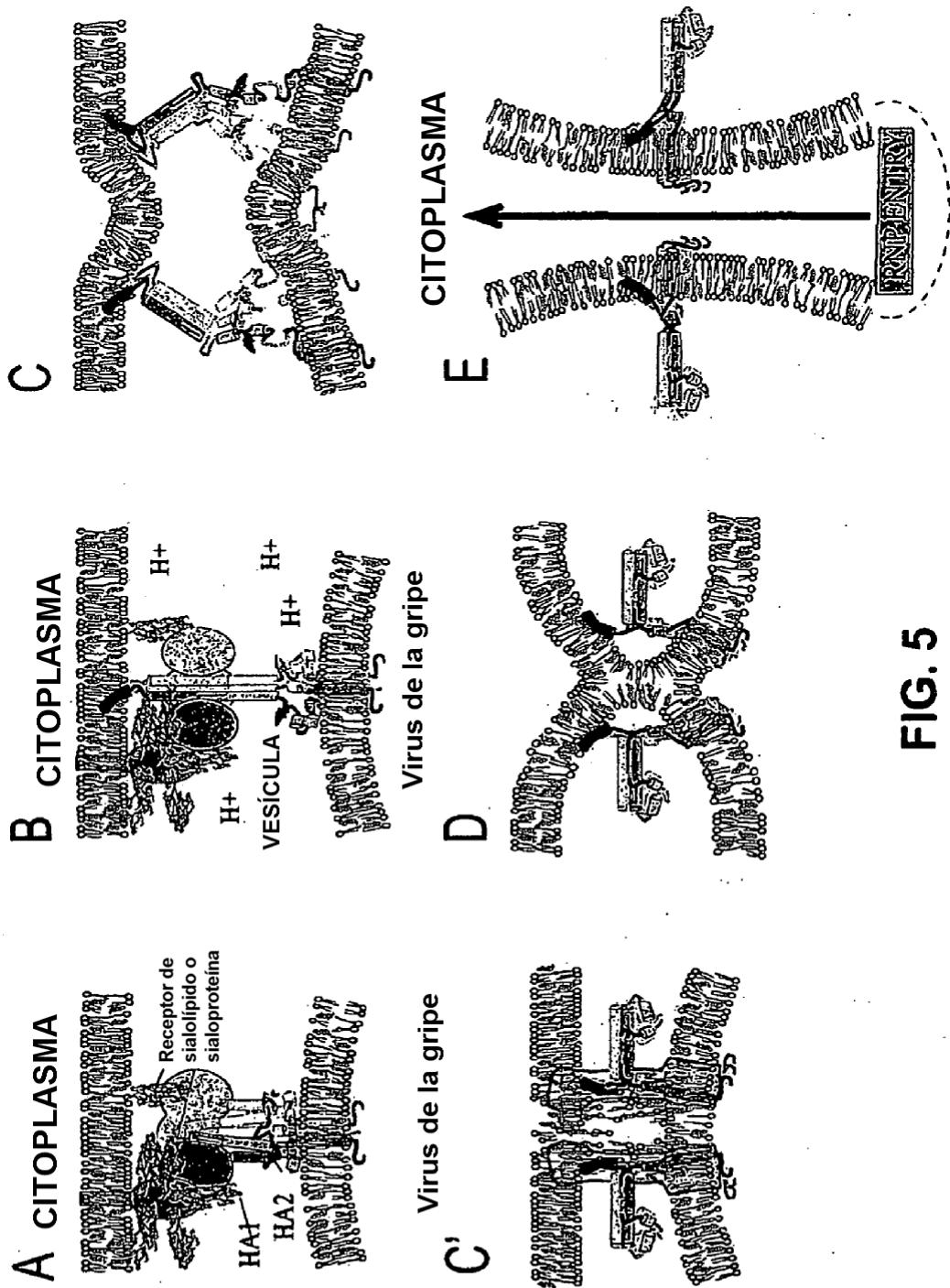
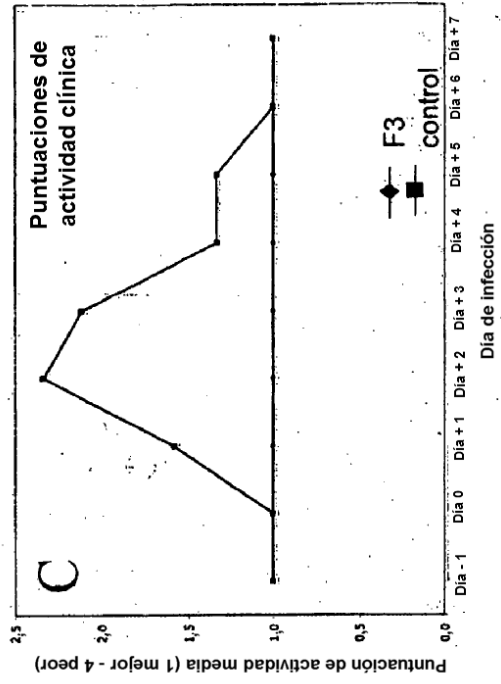
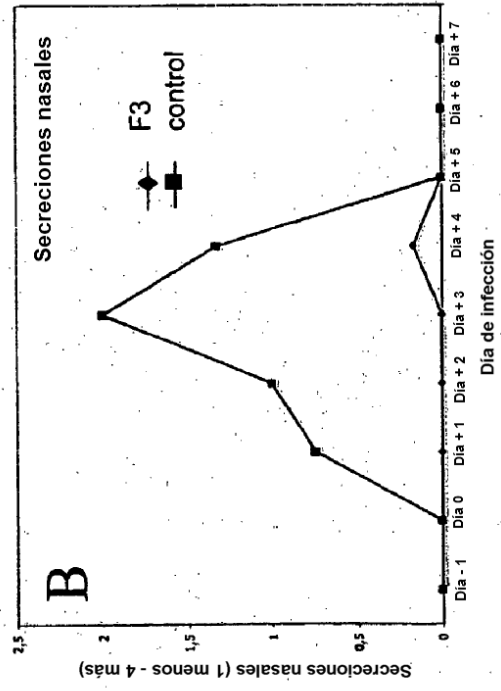
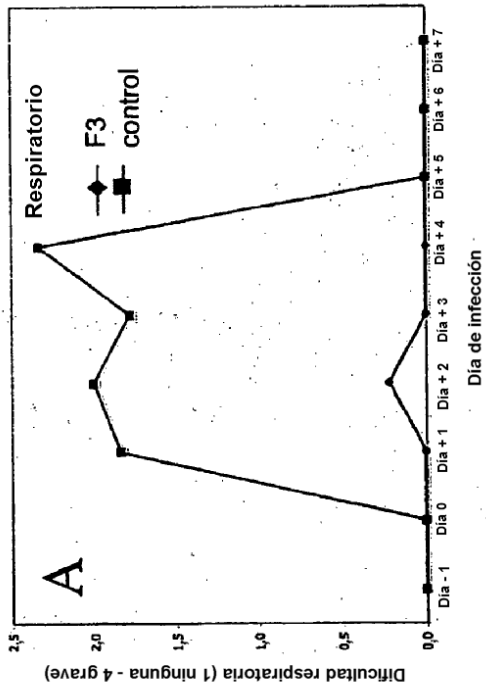


FIG. 5

FIG. 6



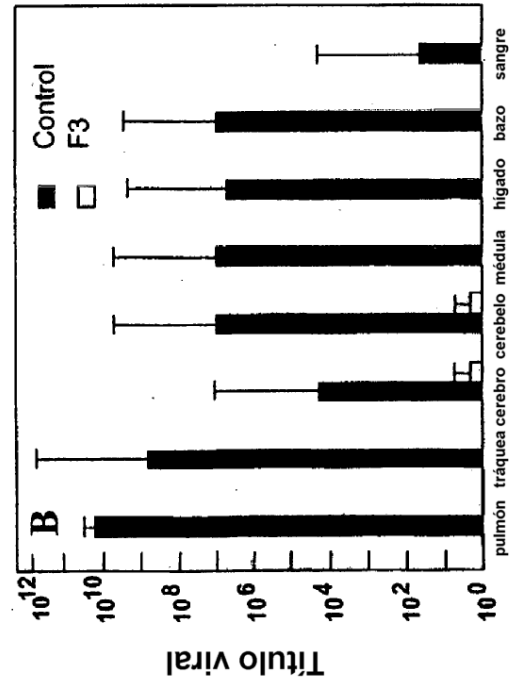
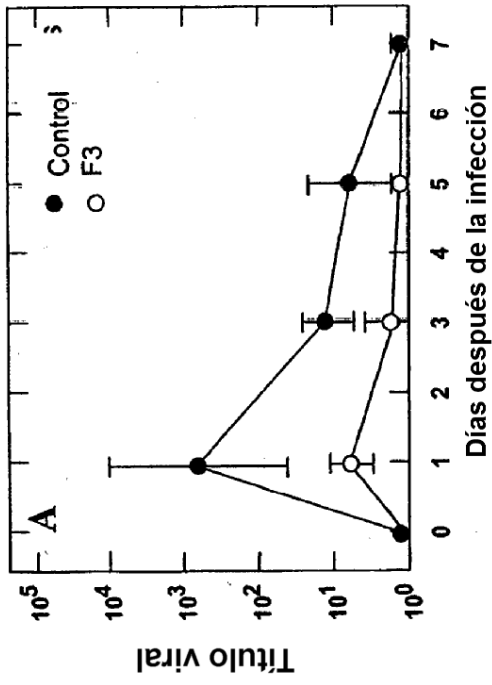


FIG. 7

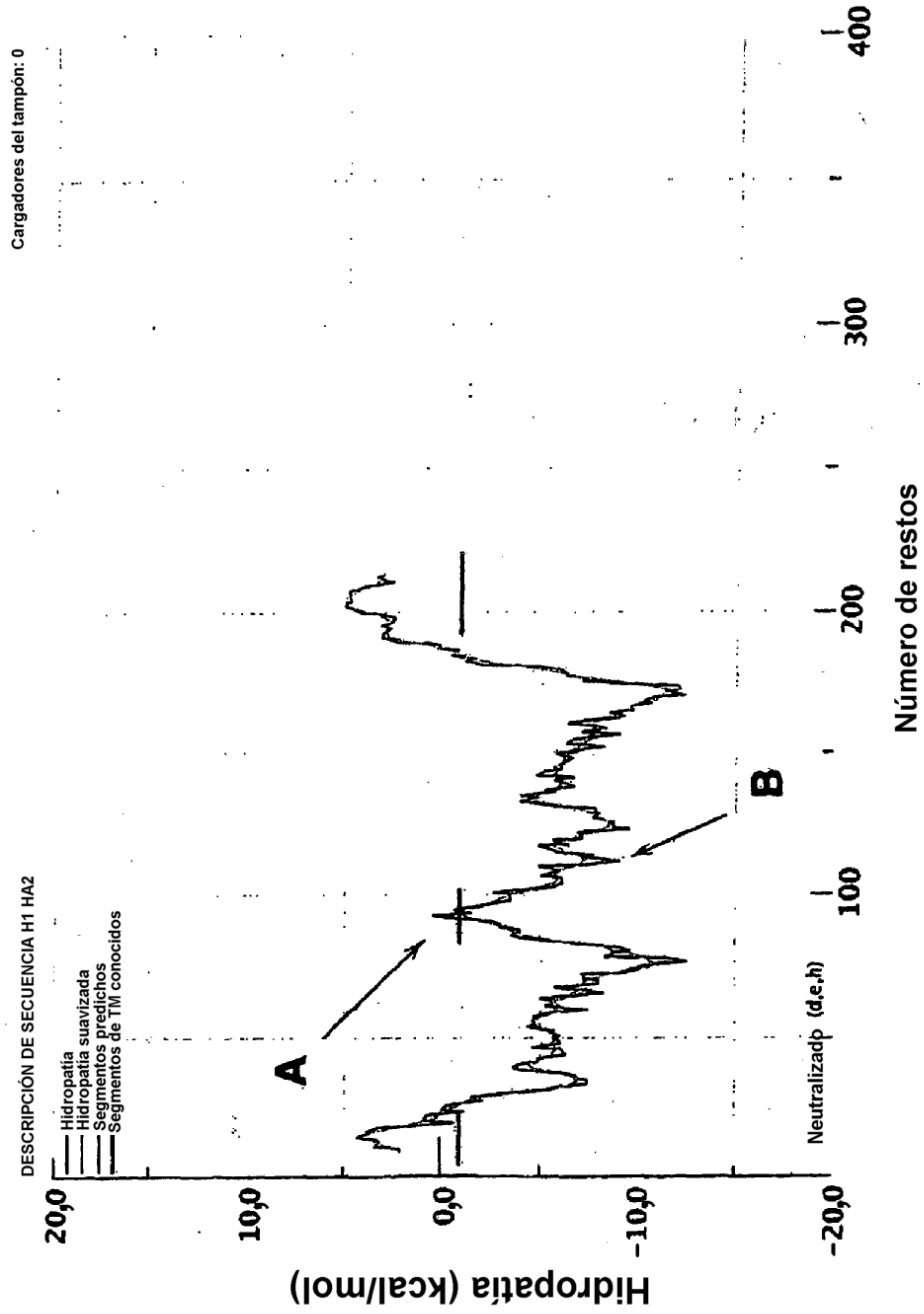


FIG. 8

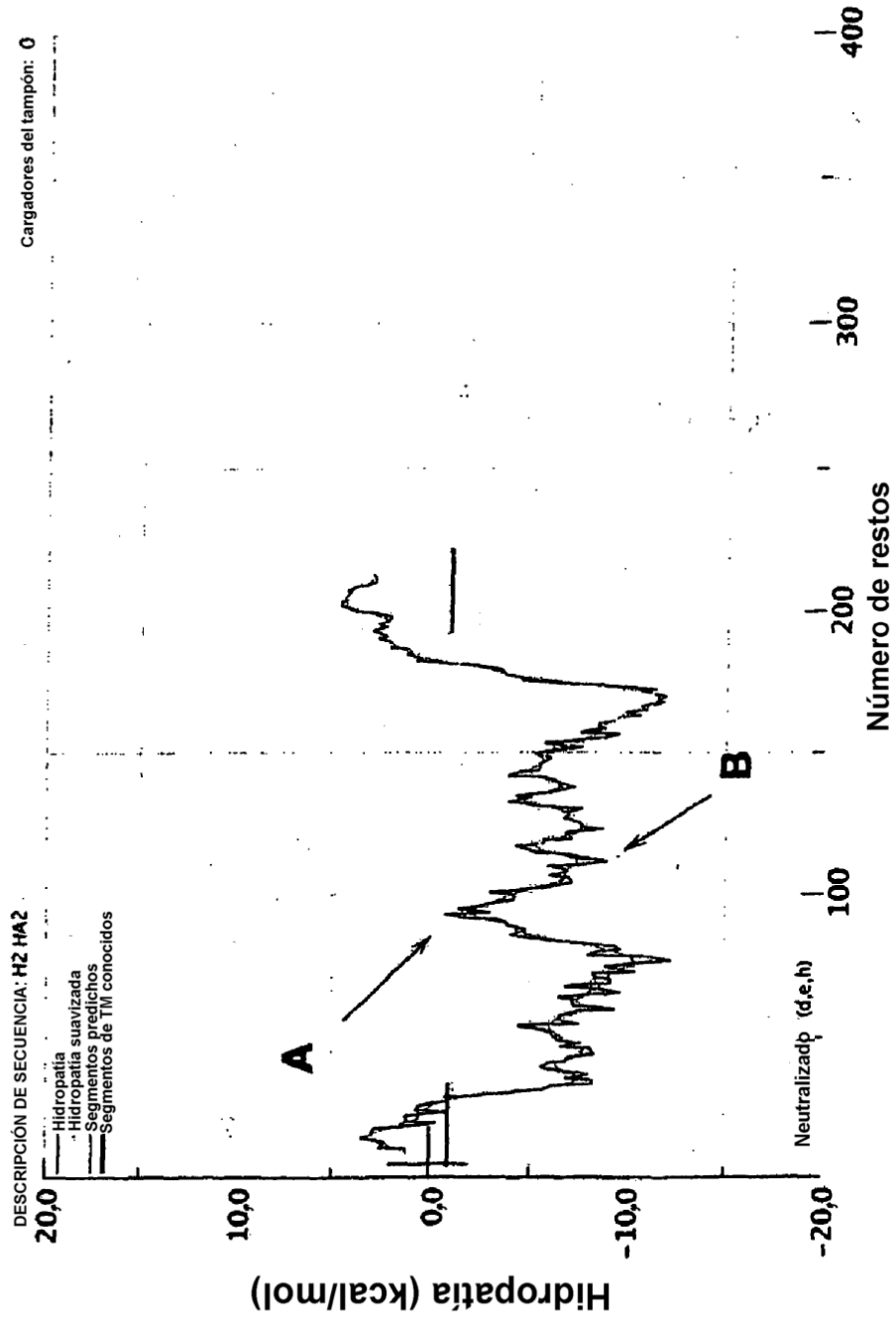


FIG. 9

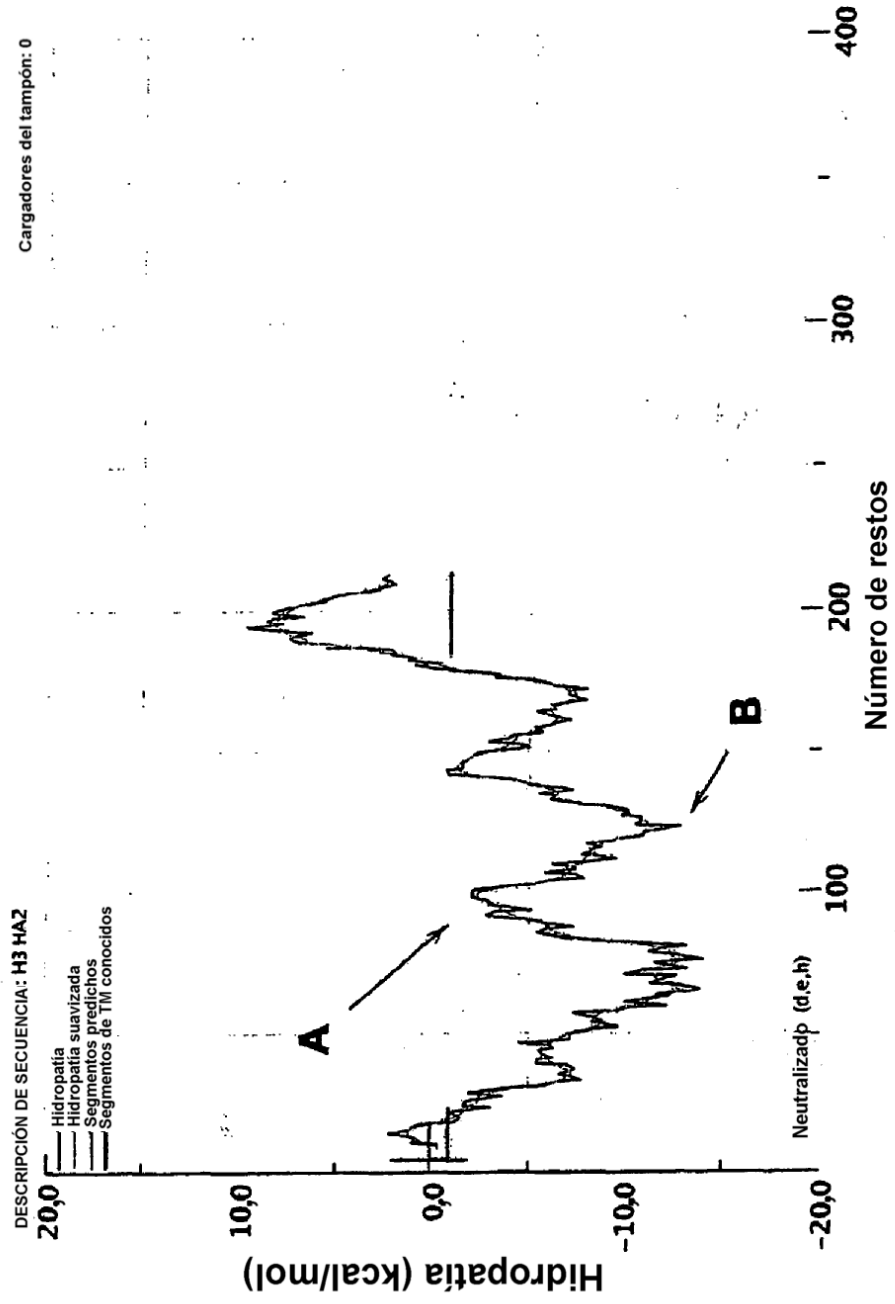


FIG. 10

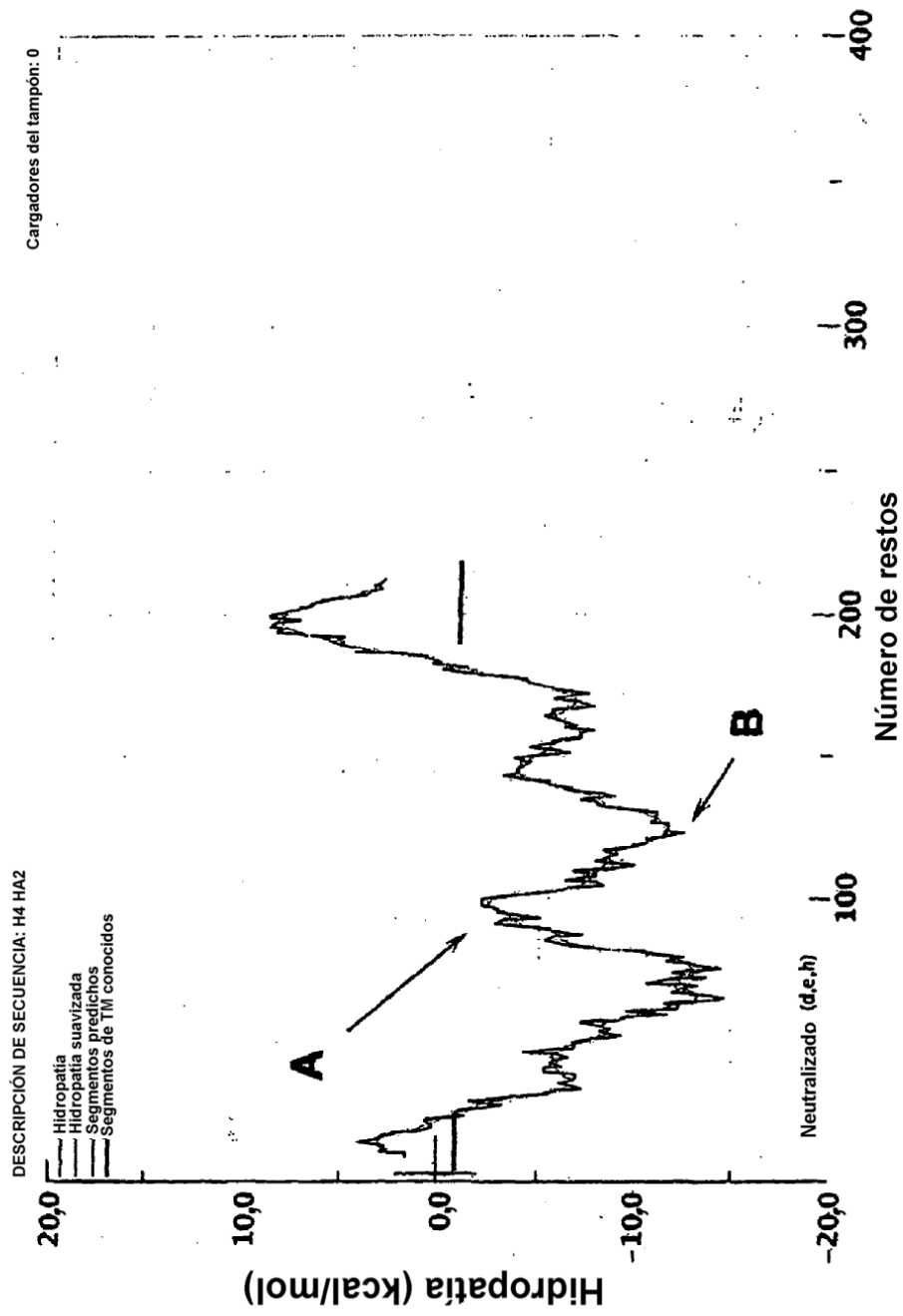


FIG. 11

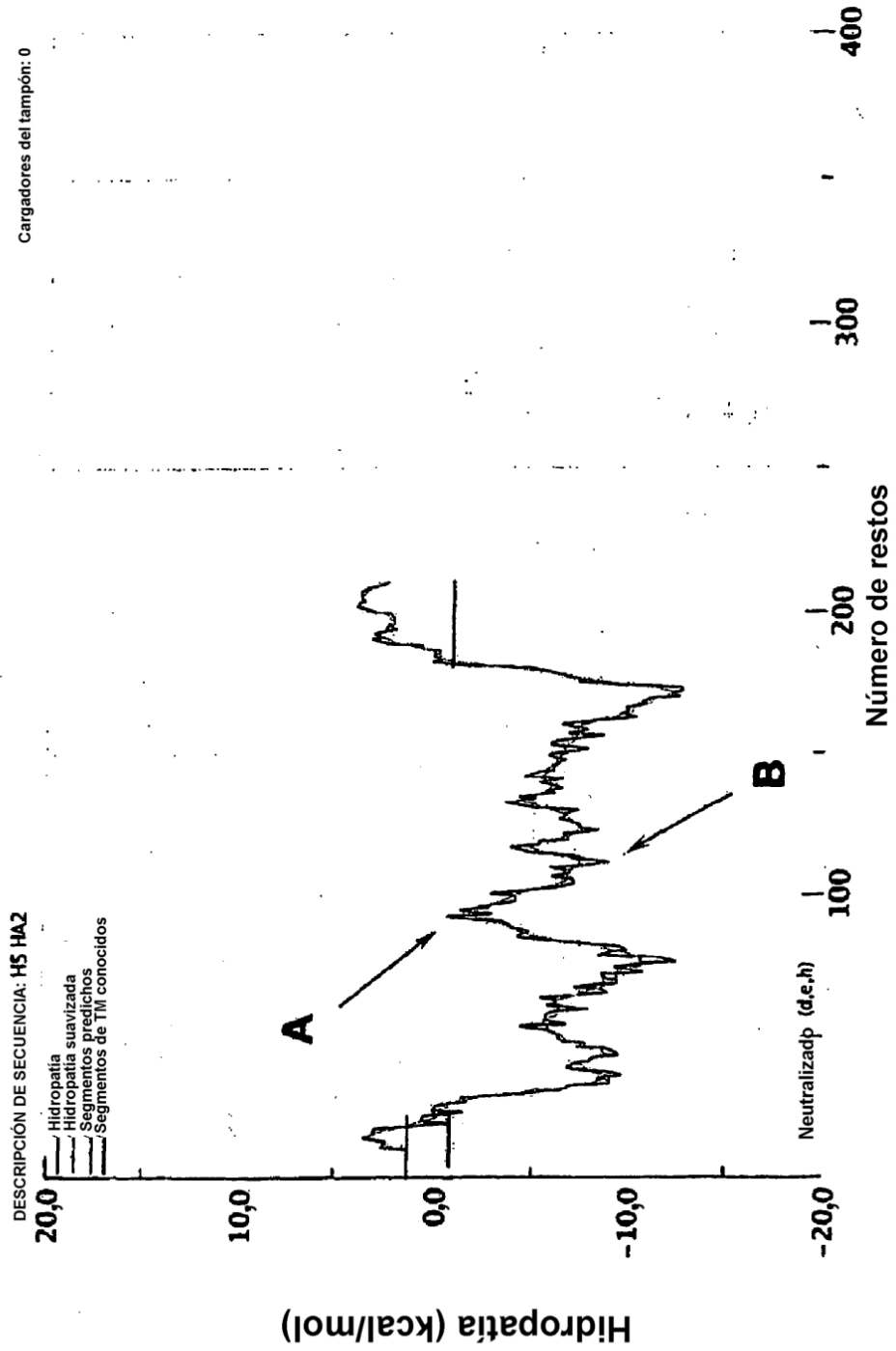


FIG. 12

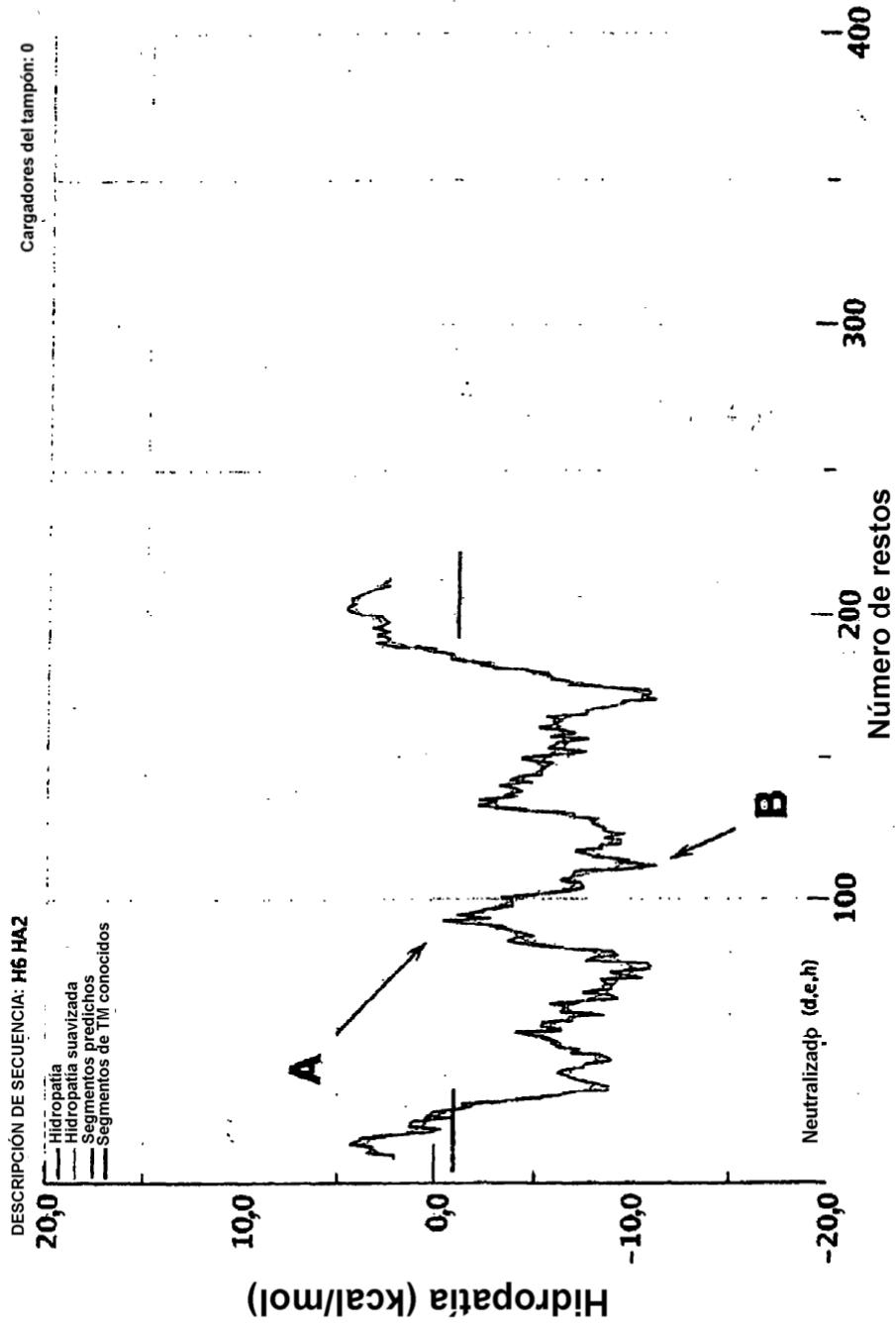


FIG. 13

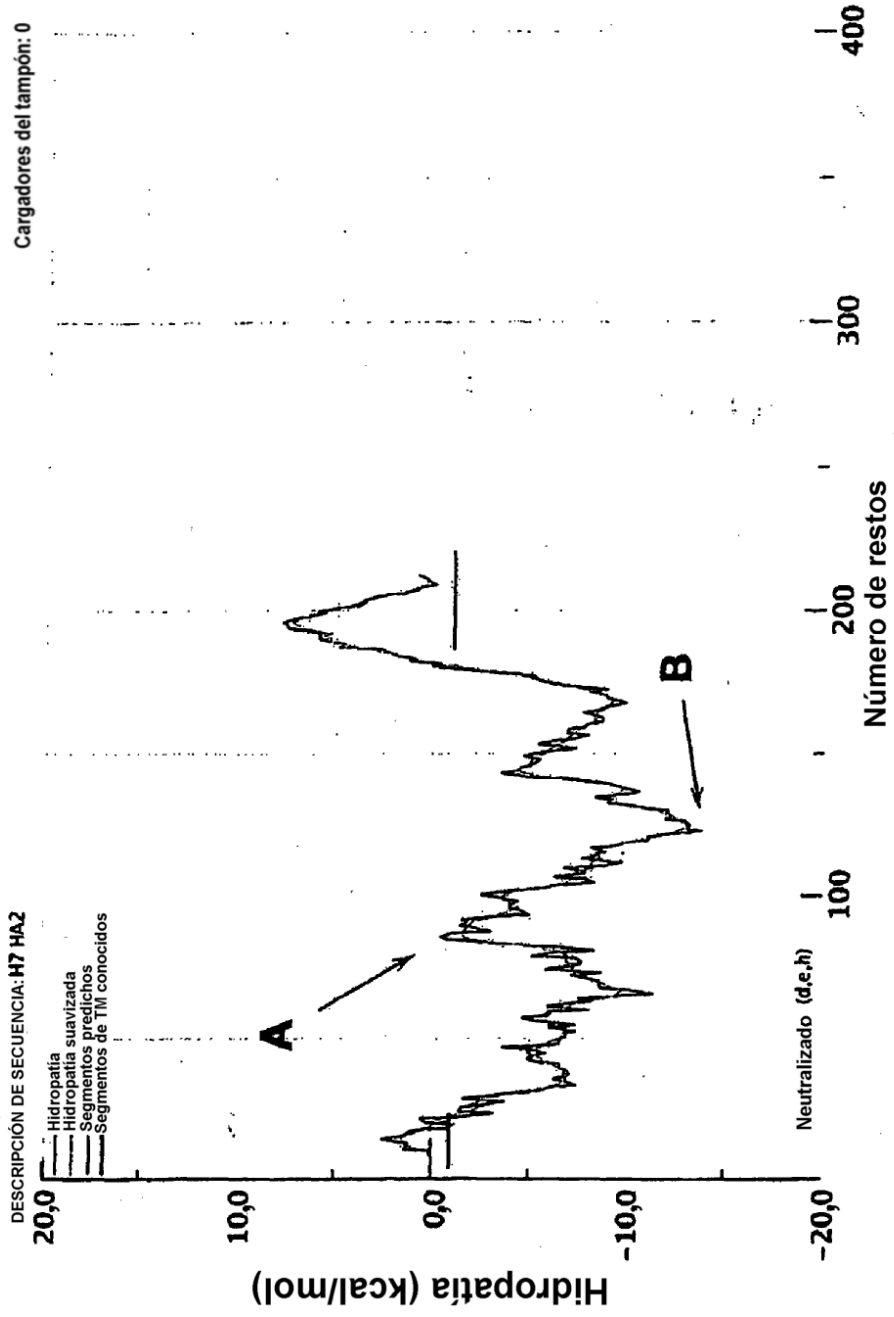


FIG. 14

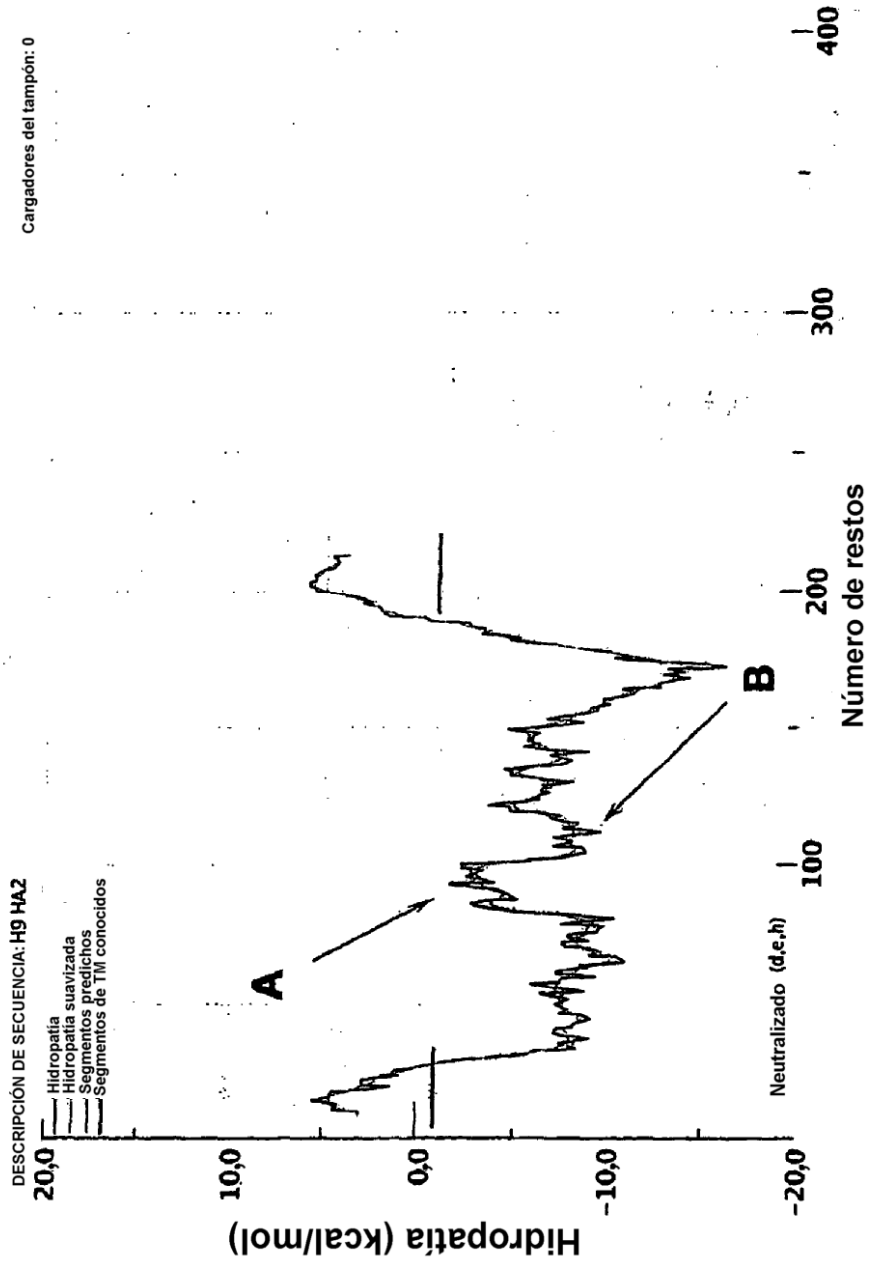


FIG. 15

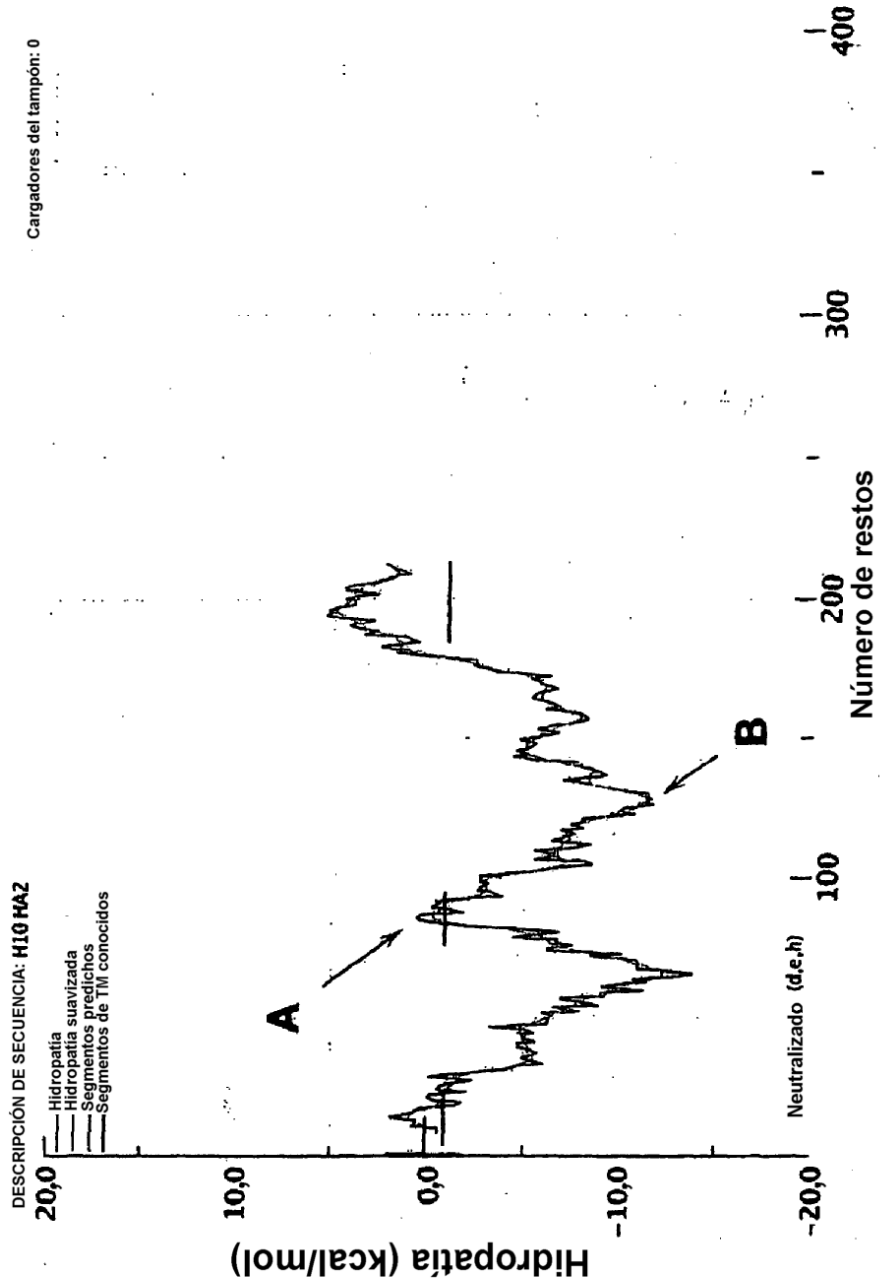


FIG. 16

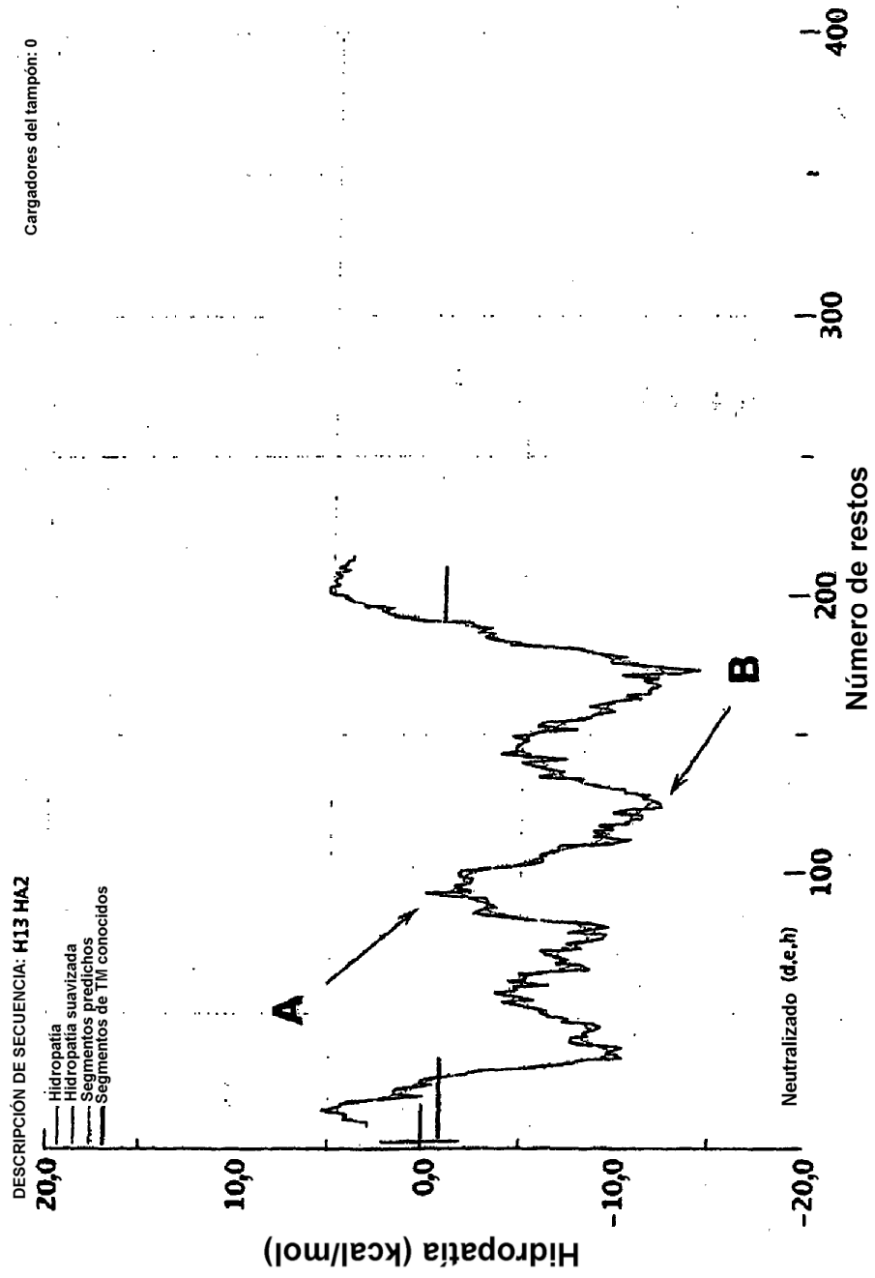


FIG. 17

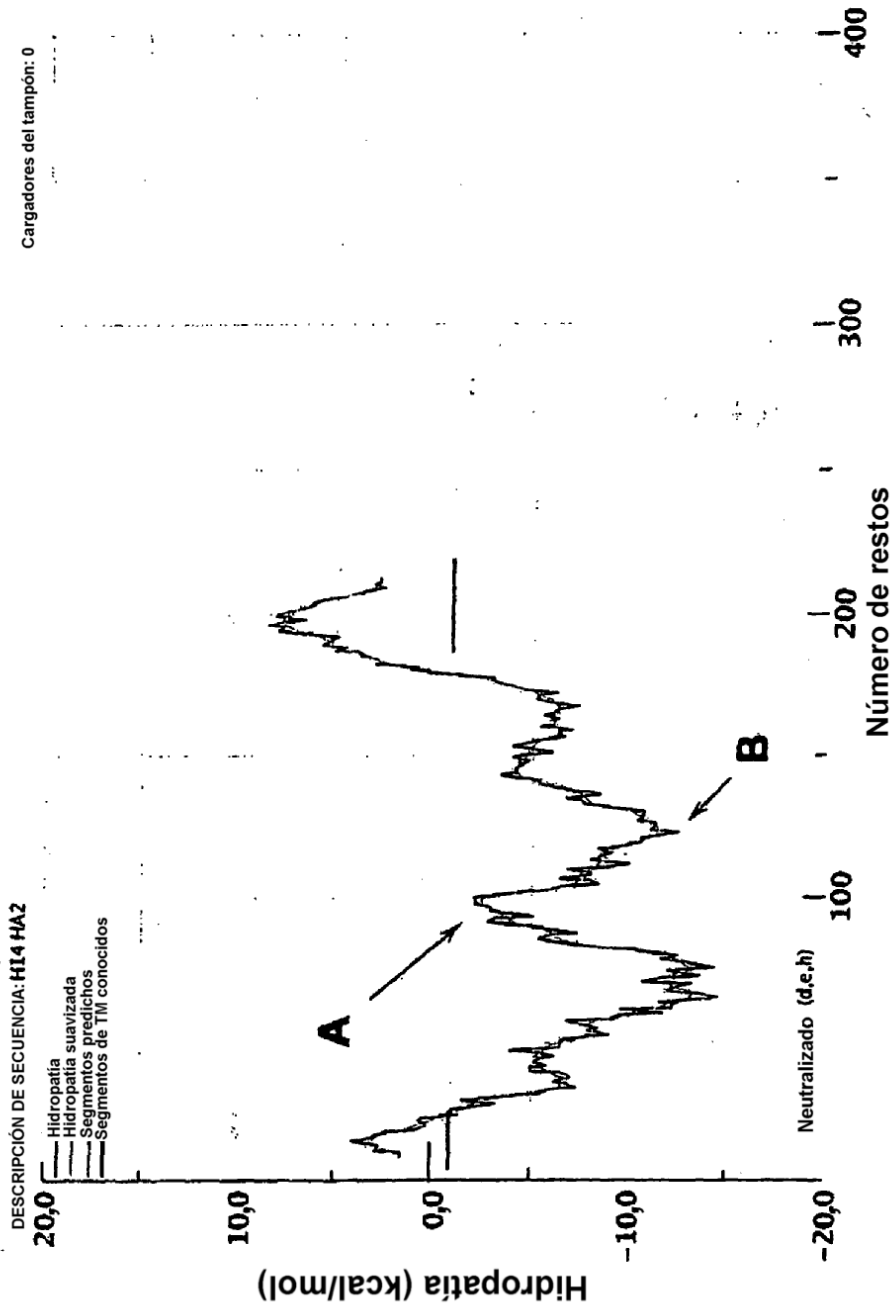


FIG. 18

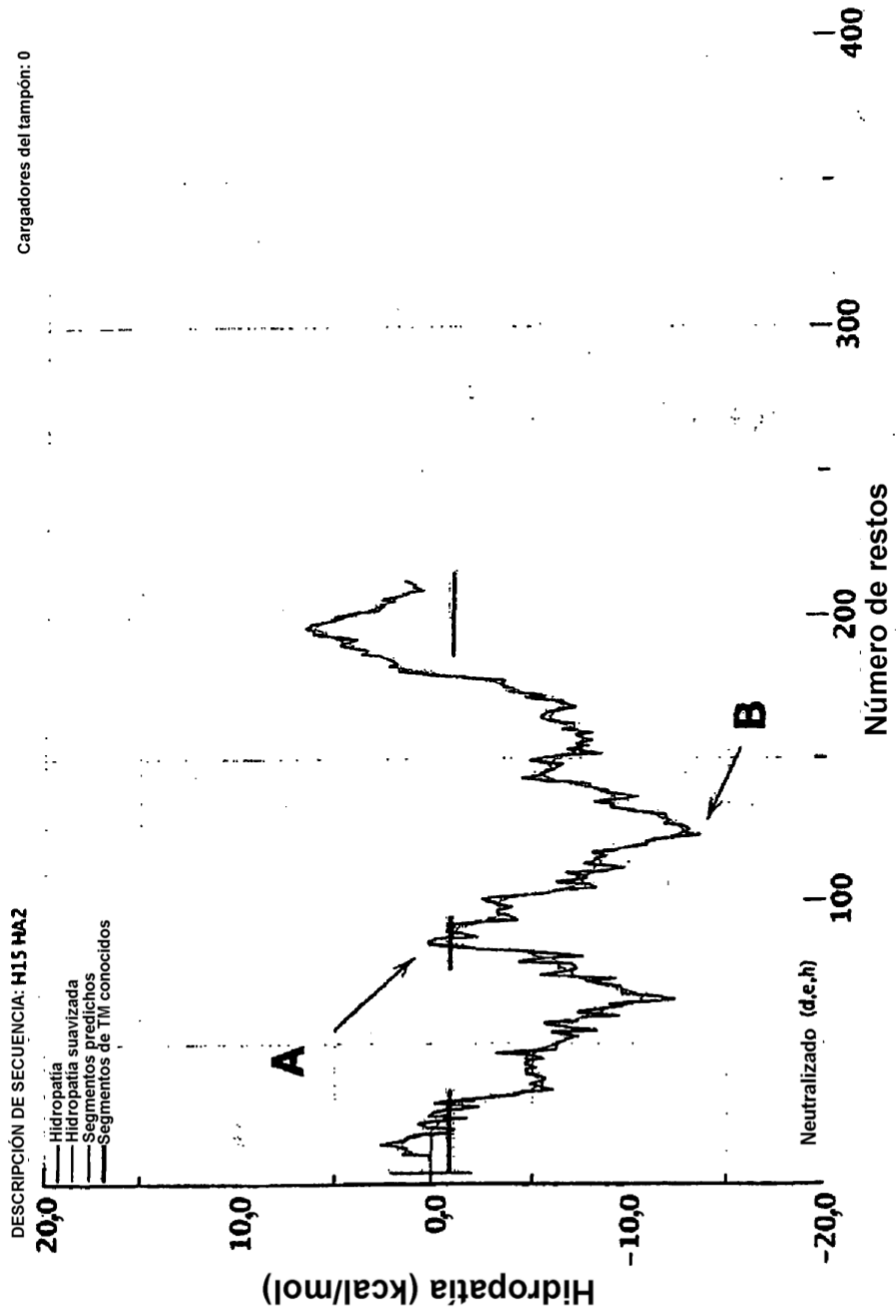


FIG. 19

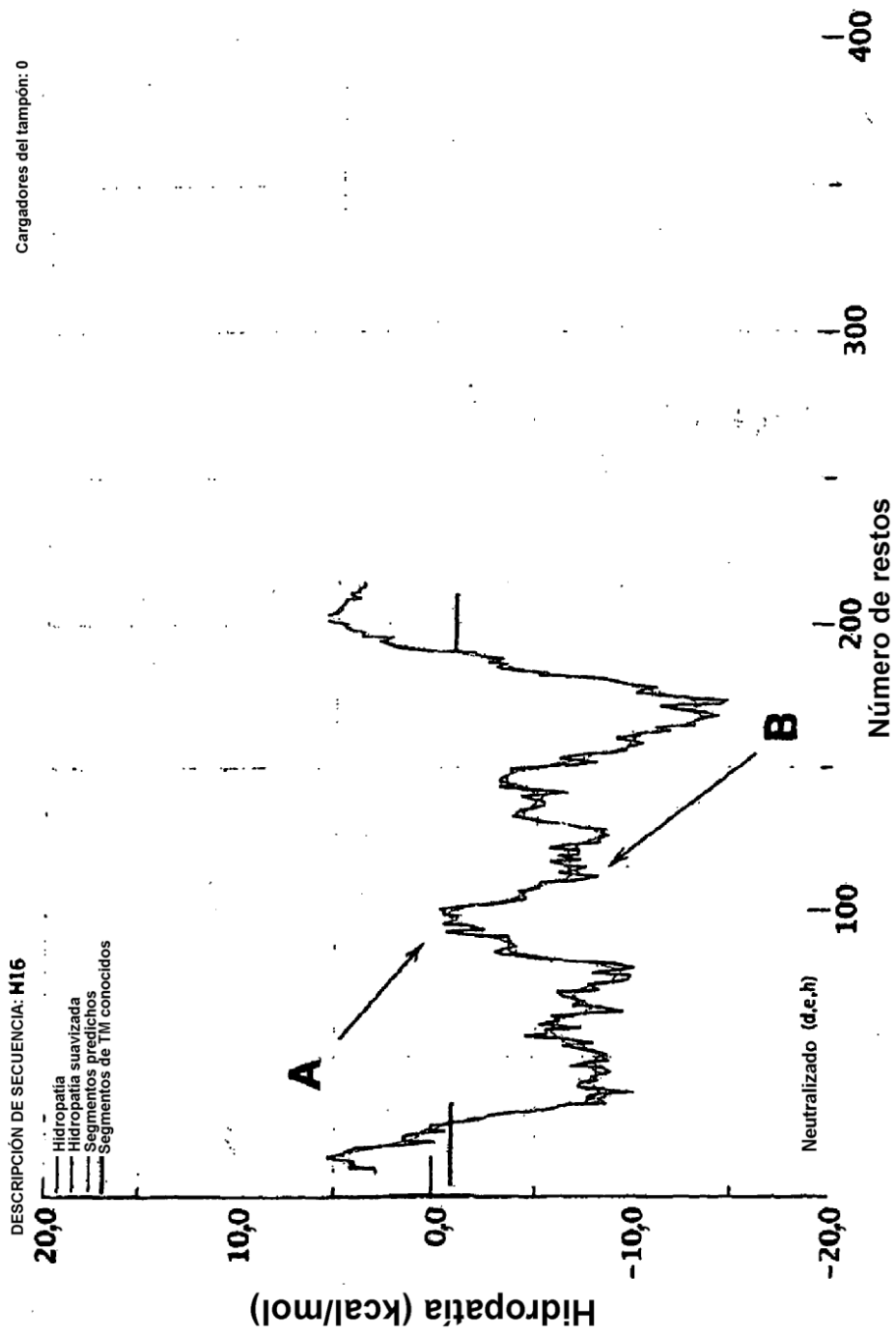


FIG. 20