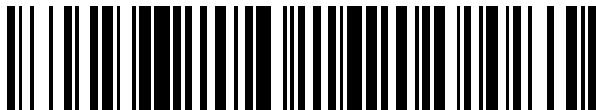


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 662 022**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/US2013/050000**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14014726**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13740452 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2874656**

(54) Título: **Vacunas atenuadas de la gripe porcina y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

17.07.2012 US 201261672398 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2018

(73) Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US**

(72) Inventor/es:

HAUSE, BENJAMIN, M.

(74) Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 662 022 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

Vacunas atenuadas de la gripe porcina y procedimientos de fabricación y uso de las mismas

- 5 [0001] La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional USSN 61/672,398, presentada el 17 de julio de 2012.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 [0002] La presente invención se refiere en general a vacunas atenuadas virales, particularmente aquellas que proporcionan una protección amplia, segura y eficaz para cerdos contra infecciones/enfermedades causadas por la gripe porcina. La invención se refiere además a procedimientos de producción de los virus atenuados, y a la identificación de variaciones de ácido nucleico que se asocian con una disminución de la virulencia del virus atenuado.
- 15 [0003] La presente invención se refiere por tanto a composiciones inmunogénicas o de vacuna que comprenden los virus de la invención; por ejemplo, virus atenuados vivos. Los virus también podrían estar inactivados en las composiciones; pero puede ser ventajoso que los virus sean de la gripe porcina vivos atenuados. La invención se refiere por lo tanto además a procedimientos para preparar y/o formular tales composiciones; por ejemplo, cultivar o desarrollar o propagar los virus sobre o en un medio adecuado, recoger los virus, opcionalmente inactivar los virus, y opcionalmente mezclar con un portador, excipiente, diluyente o vehículo adecuados veterinaria o farmacéuticamente aceptables, y/o un adyuvante y/o estabilizante. Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de los virus en la formulación de tales composiciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 25 [0004] Los virus de la gripe poseen un número de mecanismos para eludir la inmunidad humoral del huésped contra la hemaglutinina (HA) que media en la entrada viral. La redistribución de los segmentos del genoma puede conducir a un cambio antigenético, mientras que la acumulación gradual de mutaciones conduce a la deriva genética (Desselberger U, et al. 1978, Schild G, et al. 1974). Además de las mutaciones en los epítopos antigenicos de la HA que pueden afectar a la capacidad de los anticuerpos preexistentes para reconocer la HA mutante, mutaciones en la glicosilación unida a N de HA pueden promover la evasión viral de reconocimiento de anticuerpos mediante la alteración de la capa de oligosacárido que rodea la HA (Schulze TI, 1997). Los residuos de glicano pueden restringir la unión de algunos anticuerpos a sus epítopos, lo que lleva a la pérdida de reconocimiento e inmunogenicidad de los anticuerpos en un fenómeno conocido como protección de glicanos (Wanzeck K, et al. 2011, Wei CJ, et al. 2010). Además, la mutación y la deriva genética preferentemente se producen en las posiciones en la cabeza globular de HA que no están protegidas por glicanos (Das SR, et al. 2010). Los residuos de glicano también influyen en la unión al receptor y por lo tanto pueden afectar a la cinética de la replicación viral.

- 40 [0005] La evolución de los virus de la gripe con frecuencia incluye la modificación del número y posición de los sitios de glicosilación (Long J, et al. 2011). Para los virus H3N2, el número de sitios de glicosilación ha aumentado de dos a diez en los últimos 40 años (4). Sin embargo, una HA cada vez más glicosilada se ha correlacionado con la disminución de la virulencia en ratones y una aptitud viral reducida (Das SR, et al. 2011, Vigerust DJ, et al., 2007). Aunque el aumento de la glicosilación puede proteger la HA de anticuerpos neutralizantes, la afinidad viral para los receptores celulares disminuye obligatoriamente (Abe Y, et al. 2004, Das SR, et al. 2011). También, se requieren mutaciones compensatorias en la HA o la neuraminidasa (NA) para equilibrar la unión al receptor y liberar actividades (Wagner R, et al. 2000). Estas mutaciones compensatorias en NA se han asociado con la adquisición de resistencia natural a los inhibidores de NA (Hensley SE, et al. 2011).

- 50 [0006] Numerosos linajes genéticos y antigenicamente diferentes de virus de la gripe porcina circulan simultáneamente en cerdos, incluyendo los virus H1N1 y H1N2 de los grupos β, γ y δ, así como el subtipo H3N2 (Lorusso A, et al. 2012). El grupo δ se subdividió originalmente en dos subgrupos (δ-I y δ-II), sin embargo, trabajos más recientes demostraron cinco subgrupos genéticos distintos (δ-A, δ-B, δ-C, δ-D, δ-E) que representan al menos tres grupos antigenicamente distintos (Hause BM, et al. 2011, Vincent AL, et al. 2009).

- 55 [0007] Aunque las vacunas virales muertas son eficaces cuando las cepas de la vacuna coinciden con el virus de estimulación de campo, la tasa de mutación rápida de la gripe requiere cambios de cepa frecuentes para garantizar la compatibilidad genética y antigenica entre las cepas de la vacuna y los virus circulantes. Además, los múltiples subtipos y linajes que cocirculan en los cerdos con frecuencia requieren cinco o más cepas de la vacuna con el fin de incluir representantes de cada tipo. Una única vacuna viva que provoca una inmunidad de amplio espectro ofrece un avance significativo en los programas de salud porcina.

[0008] Vincent et al. (2007) Vaccine, 25, 7.999-8.009 describe una vacuna de virus vivo modificado de la gripe que comprende una proteína NS1 truncada.

5 [0009] El documento WO 2011/091376 describe composiciones novedosas útiles como inmunógenos de la gripe.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

10 [0010] La presente invención proporciona una cepa de la gripe porcina atenuada capaz de proporcionar una respuesta inmunitaria segura y eficaz en animales porcinos contra la gripe o enfermedades causadas por la gripe, que codifica un gen de HA que tiene al menos 4 sitios de glicosilación adicionales en relación con la cepa virulenta parental, en la que los sitios de glicosilación se seleccionan de S71N, K90N, L173T, P287T, y K294T, y en la que la localización del cambio o cambios de aminoácidos se basa en el gen de HA codificada por la cepa parental virulenta que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 18.

15 [0011] La presente invención también proporciona una composición inmunológica que comprende la cepa atenuada de la invención.

20 [0012] La presente invención también proporciona una composición que comprende una pluralidad de vectores para la producción de la gripe porcina atenuada que incluye un vector que comprende un promotor unido operativamente a un ADNc de HA del virus de la gripe, en la que el ADNc de HA codifica sitios de glicosilación adicionales con relación a una HA codificada por una cepa de la gripe porcina parental virulenta, en la que los sitios de glicosilación adicionales se seleccionan de S71N, K90N, L173T, P287T y K294T, y en la que la numeración de los cambios de aminoácidos se basa en el gen de HA codificada por la cepa parental virulenta que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 18; y preferiblemente en la que el ADNc de HA para la producción de la gripe atenuada codifica la proteína tal como se expone en SEQ ID NO: 22 o 24.

25 [0013] En el presente documento se describen vacunas atenuadas, así como procedimientos para el tratamiento y profilaxis de la infección por gripe porcina.

30 [0014] En una realización, las vacunas comprenden virus de la gripe atenuados, que han sido modificados para expresar genes de HA que tienen sitios de glicosilación adicionales en relación con su cepa parental. En una realización particular, los genes y/o productos génicos de HA tienen las mismas modificaciones que están presentes entre SEQ ID NOs: 17 y 21; SEQ ID NOs: 17 y 23; SEQ ID NOs: 18 y 22; o SEQ ID NOs: 18 y 24. En aún otra realización, los genes y/o productos génicos de HA tienen al menos 4 de las 5 modificaciones. En una realización más particular, los genes y/o productos génicos de HA tienen 4 ó 5 de las modificaciones dando lugar a +4 y +5 sitios de glicosilación, en relación con los productos del gen de HA parentales.

35 [0015] En el presente documento se describen ADNc y/o plásmidos para usar en un sistema de genética inversa para la producción de la gripe atenuada de acuerdo con la presente descripción. En una realización, al menos uno de los ADNc y/o plásmidos comprende una secuencia de HA que tiene un mayor número de sitios de glicosilación con respecto a la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 18.

40 [0016] En una realización particular, la secuencia de HA es como se expone en las SEQ ID NOs: 21 o 23.

45 [0017] La presente invención se refiere además a nuevas cepas atenuadas de gripe, que proporcionan una inmunidad protectora segura, eficaz y amplia. En relación con una cepa de la gripe parental, las cepas atenuadas pueden tener sitios de glicosilación adicionales y/o sitios de glicosilación putativos codificados por sus genes de HA, cuya presencia está asociada con la virulencia reducida.

50 [0018] Se describe en el presente documento un virus mutante que comprende una mutación o mutaciones en una o más secuencias de ácidos nucleicos, en relación con el virus de tipo natural/parental, que hace que el virus mutante sea atenuado, en relación con el virus parental, cuyo virus parental comprende ácidos nucleicos que codifican una proteína HA de tipo natural. Como se define en el presente documento, la proteína HA de "tipo natural" es una que tiene el mismo número de sitios de glicosilación y/o sitios de glicosilación putativos en relación con las secuencias tal como se expone en SEQ ID NO: 18.

55 [0019] Tal como se describe en el presente documento, el virus mutante puede comprender secuencias de ácidos nucleicos de ARNv que corresponden a (es decir, son complementarios inversos y tienen uracilos en lugar de timidinas) las secuencias de ADN expuestas en las SEQ ID NOs: 21 o 23, que codifican para los péptidos tal como se exponen en las SEQ ID NOs: 22 o 24, respectivamente, y que hacen que el virus mutante sea atenuado/no virulento, en relación con el virus de tipo natural/parental virulento.

5 [0020] Tal como se define en el presente documento, el término "gen" se utilizará en un sentido amplio, y abarcará tanto las secuencias codificantes como las no codificantes (es decir, secuencias reguladoras en dirección 5' y 3', promotores, UTR 5'/3', intrones, y exones). Cuando se pretende hacer referencia a solamente una secuencia de codificación de un gen, el término "secuencia codificante de gen" o "CDS" se utilizan indistintamente en toda esta descripción. Cuando se describe un ácido nucleico específico, por ejemplo, la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 17 (la secuencia de ADN equivalente de la cadena "sentido" de ARNc del virus parental), el experto en la materia al instante estará en posesión de todas las formas derivables de esa secuencia (ARNm, ARNv, ARNc, ADN, proteína, etc.). Por ejemplo, el virus de la gripe es un virus ARN de cadena negativa (ARNss). Para replicar, su ARNss negativo (que se define en el presente documento como "ARNv") debe ser transcrita a ARN positivo o de sentido (definido en el presente documento como "ARNc"). La maquinaria de la célula huésped es cooptada para utilizar el ARNc para producir las proteínas virales y el ARNv. Un experto en la materia utilizando el código genético conocido puede derivar rutinariamente a partir de una secuencia de ADN el ARNv, ARNc, y las secuencias de péptidos.

10 15 [0021] En una realización particular, las vacunas atenuadas comprenden un adyuvante. El adyuvante puede ser cualquier sustancia que aumenta y/o incrementa la respuesta inmunitaria provocada, en comparación con la vacuna atenuada sola. Los adyuvantes de la mucosa, incluyendo quitosanos y derivados de los mismos, son particularmente útiles para las vacunas atenuadas orales descritas.

20 25 [0022] Se describen en el presente documento procedimientos para inducir una respuesta inmunológica (o inmunogénica) o protectora contra la gripe, así como los procedimientos para prevenir o tratar la gripe, o el estado o estados patológicos causados por la gripe, que comprende administrar el virus atenuado, o una composición que comprende el virus atenuado a animales en necesidad del mismo.

30 35 [0023] También se describen en el presente documento kits que comprenden al menos la cepa de la gripe atenuada y las instrucciones para su uso.

[0024] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de y abarcadas por la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 45 [0025] Una divulgación completa y practicable de la presente invención, incluyendo el mejor modo de la misma, para un experto en la materia, se expone más particularmente en el resto de la memoria descriptiva, incluyendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 presenta el genotipo de los virus creados mediante genética inversa;

la figura 2 es un alineamiento de aminoácidos entre la SEQ ID NO: 18 (proteína HA del virus de la gripe parental) y SEQ ID NO: 22 (proteína HA del mutante con n + 5 glicosilaciones);

40 45 la figura 3 es un gráfico del crecimiento de células cultivadas de virus de la gripe parental y mutantes de glicosilación que albergan entre 1 y 5 sitios de glicosilación adicionales en su gen de HA, en relación con el parental; la figura 4 es una tabla que enumera las SEQ ID de esta divulgación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 55 [0026] Se describen en el presente documento secuencias de nucleótidos y genes implicados en la atenuación de un microorganismo, tal como virus, por ejemplo, la gripe, los productos (por ejemplo, proteínas, antígenos, inmunógenos, epítropos) codificados por las secuencias de nucleótidos, los procedimientos para producir dichas secuencias de nucleótidos, productos, microorganismos, y usos de los mismos, tales como para la preparación de la vacuna o composiciones inmunogénicas o para provocar una respuesta inmunológica o inmunitaria o como un vector, por ejemplo, como un vector de expresión (por ejemplo, un vector de expresión in vitro o in vivo).

[0027] Las mutaciones introducidas en las secuencias de nucleótidos y genes de microorganismos producen mutantes atenuados novedosos y no obvios. Estos mutantes son útiles para la producción de composiciones inmunogénicas atenuadas vivas o vacunas atenuadas vivas que tienen un alto grado de inmunogenicidad.

55 60 [0028] La identificación de las mutaciones proporciona secuencias de nucleótidos y genes nuevos y no obvios, así como productos génicos codificados por las secuencias de nucleótidos y los genes novedosos y no obvios.

[0029] En una realización, la presente invención proporciona una cepa de la gripe porcina atenuada capaz de proporcionar una respuesta inmunitaria segura y eficaz en cerdo contra la gripe o enfermedades causadas por la gripe. En una

realización, la cepa codifica un gen de HA que tiene al menos 4 sitios de glicosilación adicionales en relación con la cepa virulenta parental.

- 5 **[0030]** En otra realización, la cepa atenuada puede codificar un gen de HA que tiene 4 o 5 sitios de glicosilación adicionales en relación con la cepa parental virulenta. En una realización particular, los sitios de glicosilación de la cepa se seleccionan de S71N, K90N, L173T, P287T, y K294T, con las localizaciones de los cambios de aminoácidos basados en un gen de HA que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 18.
- 10 **[0031]** En una realización, la proteína HA producida por la cepa de la gripe atenuada tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 22.
- 15 **[0032]** En otra realización, la proteína HA producida por la cepa de la gripe atenuada tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 24
- 20 **[0033]** Como se describe en el presente documento, la proteína HA producida por la cepa de la gripe atenuada puede tener la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 22 o una secuencia con al menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 22 siempre que las siguientes localizaciones tengan los siguientes aminoácidos: 71N, 90N, 173T, 287T y 294T.
- 25 **[0034]** Como se describe en el presente documento, la gripe atenuada puede producir una proteína HA que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 24 o una secuencia con al menos un 90% de homología con la SEQ ID NO: 24 siempre que las siguientes localizaciones tengan los siguientes aminoácidos: 71N, 90N, 173T, 287T.
- 30 **[0035]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunológica que comprende cepas de la gripe atenuadas, que codifican proteínas HA hiperglicosiladas. En una realización, las composiciones pueden comprender además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.
- 35 **[0036]** En una realización, la composición proporciona una respuesta inmunitaria protectora en cerdo contra la estimulación con gripe porcina virulenta. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos un antígeno adicional asociado con un patógeno distinto de la gripe porcina.
- 40 **[0037]** En otra realización, dicho al menos un antígeno adicional se selecciona de *M. hyo*, PCV2, PRRSV, SIV o de otro patógeno capaz de infectar y causar enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad en un cerdo, o combinaciones de los mismos.
- 45 **[0038]** En una realización, la presente invención proporciona la composición de la invención para su uso en la vacunación de un animal porcino. En otra realización, el animal porcino es una cerda de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 6 semanas antes de parir. En aún otra realización, los lechones resultantes pueden tener una reducción de la morbilidad y/o mortalidad en comparación con los lechones procedentes de las cerdas no vacunadas.
- 50 **[0039]** En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de vectores para la producción de la gripe porcina atenuada que incluye un vector que comprende un promotor unido operativamente a un ADNc de Ha del virus de la gripe, en la que el ADNc de HA codifica sitios de glicosilación adicionales con relación a una HA codificada por una cepa de la gripe porcina parental virulenta. En una realización particular, los sitios de glicosilación adicionales se seleccionan de S71N, K90N, L173T, P287T, y K294T, y la localización de los cambios de aminoácidos se basa en un gen de HA que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 18.
- 55 **[0040]** En una realización, el ADNc de HA para la producción de la gripe atenuada codifica la proteína tal como se expone en la SEQ ID NO: 22. En otra realización, el ADNc de HA codifica la proteína tal como se expone en la SEQ ID NO: 24.
- 60 **[0041]** En el presente documento se describe un procedimiento para preparar el virus de la gripe, que comprende: poner en contacto una célula con una de las composiciones de la invención en una cantidad eficaz para producir el virus de la gripe infeccioso. Tal como se describe en el presente documento, el procedimiento puede comprender además aislar el virus.
- 65 **[0042]** En el presente documento se describe un procedimiento para preparar un vehículo de liberación génica, que comprende: poner en contacto las células con la composición de la invención en una cantidad eficaz para producir virus de la gripe y aislar el virus. También se describe en el presente documento una célula en contacto con la composición de la invención.

- [0043] En el presente documento se describe una célula de vertebrado que comprende una pluralidad de vectores para la producción de la gripe porcina atenuada que incluye un vector que comprende un promotor unido operativamente a un ADNc de HA de virus de la gripe, en el que el ADNc de HA codifica sitios de glicosilación adicionales con relación a una HA codificada por una cepa de la gripe porcina parental virulenta.
- 5 [0044] En el presente documento se describen productos génicos, que proporcionan antígenos, inmunógenos y epítopos, y son útiles como productos génicos aislados.
- 10 [0045] Dichos productos génicos aislados, así como los epítopos de los mismos, también son útiles para generar anticuerpos, que son útiles en aplicaciones de diagnóstico.
- [0046] Dichos productos génicos, que pueden proporcionar o generar epítopos, antígenos o inmunógenos, también son útiles para composiciones inmunogénicas o inmunológicas, así como vacunas.
- 15 [0047] En el presente documento se describen virus que contienen una mutación atenuante en una secuencia de nucleótidos o un gen, en el que la mutación modifica la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificada por un gen, dando como resultado una virulencia atenuada del virus.
- 20 [0048] En particular, en el presente documento se describen cepas atenuadas de la gripe porcina y vacunas que comprenden las mismas, que provocan una respuesta inmunogénica en un animal, en particular las cepas de la gripe porcina atenuadas que provocan, inducen o estimulan una respuesta en un cerdo.
- 25 [0049] Las cepas atenuadas particulares de interés de la gripe porcina tienen mutaciones en genes, con relación a la cepa parental virulenta de tipo natural, que están asociados con la virulencia. Se reconoce que, además de cepas que tienen las mutaciones descritas, se pueden utilizar en la práctica de esta invención cepas atenuadas que tengan cualquier número de mutaciones en los genes de virulencia descritos.
- 30 [0050] En otro aspecto, las cepas atenuadas de la gripe porcina novedosas se formulan en una vacuna segura, eficaz contra la gripe porcina e infecciones/enfermedades causadas por la gripe porcina.
- [0051] En una realización, las vacunas de la gripe porcina comprenden además un adyuvante. En una realización particular, el adyuvante es un adyuvante de la mucosa, tal como quitosano, quitosano metilado, quitosano trimetilado, o derivados o combinaciones de los mismos.
- 35 [0052] En una realización, el adyuvante comprende bacterias y/o virus completos, incluyendo *H. parasuis*, Clostridium, virus de la gripe porcina (SIV), circovirus porcino (PCV), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, *Escherichia coli*, o combinaciones y/o variaciones de los mismos. En varias realizaciones, el adyuvante aumenta la producción del animal de IgM, IgG, IgA, y/o combinaciones de las mismas.
- 40 [0053] Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una parte o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítopo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.
- 45 [0054] Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o componente bioactivo.
- 50 [0055] El término "polipéptido inmunogénico o antigénico", como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez administrados al huésped, son capaces de evocar una respuesta inmunitaria de tipo humorar y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína según la invención comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítopo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento

inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier cantidad de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en el sector. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, síntesis simultánea de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondencia de los péptidos a partes de la molécula de proteína, y reacción de los péptidos con anticuerpos, mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el sector y se describen en, por ejemplo, la patente

5 de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Los procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de *T. parva* se describen completamente en el documento PCT/US2004/022605.

10 [0056] Como se describe en el presente documento, la invención abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por lo tanto, el término "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera

15 que el residuo de aminoácido codificado no cambie o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante

20 sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre

25 que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunoreaccionen con el polipéptido no sustituido.

30 [0057] El término "epítopo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

35 [0058] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidos específicamente a un antígeno o抗ígenos incluidos en el

40 composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de manera que la resistencia a la nueva infección se verá reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas y/o signos clínicos de la enfermedad normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

45 [0059] Por "animal" se pretende mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped tal como se usa en el presente documento incluye mamíferos y humanos. El animal puede ser seleccionado del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado vacuno), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, aveSTRUZ, emu y casuario), primates (por ejemplo, prosimios, tarsero, mono, gibón, simio), hurones, focas, y pescado. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo recién nacido, embrionario y etapas fetales.

50 [0060] A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta

descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 5 [0061] Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y los términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Composiciones

- 15 [0062] La presente invención se refiere a una vacuna o composición de la gripe porcina que puede comprender una cepa atenuada de la gripe porcina y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal.

- 20 [0063] El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los bloqueos terminales, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener mediante síntesis química o derivarse de un microorganismo.

- 30 [0064] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias codificantes como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

- 40 [0065] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce el componente de forma natural, por ejemplo, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por tecnología recombinante, así como mediante síntesis química.

- 45 [0066] El término "variación conservativa" indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico, de manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente conservativas en la naturaleza, tal como se describe anteriormente.

- 50 [0067] El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

- 55 [0068] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

- 60 [0069] Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias codificantes adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo o un promotor diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación

homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier constructo tal como pueden ser deseable para proporcionar realizaciones de esta invención.

Procedimientos de uso y artículo de fabricación

- 5 [0070] La presente invención incluye la composición de la invención para su uso en la vacunación de un animal porcino que comprende administrar la composición de la invención al animal.
- 10 [0071] En una realización de la invención, se puede emplear un régimen de sensibilización-refuerzo, que se compone de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno común. Típicamente, la composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria es de naturaleza diferente de las utilizadas como refuerzo. Sin embargo, se observa que la misma composición se puede utilizar como administración primaria y administración de refuerzo. Este protocolo de administración se llama "sensibilización-refuerzo".
- 15 [0072] Un régimen de sensibilización-refuerzo comprende al menos una sensibilización-administración y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la sensibilización-administración puede ser de naturaleza diferente a las utilizadas como una vacuna de refuerzo posterior. La sensibilización-administración puede comprender una o más administraciones. Del mismo modo, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.
- 20 [0073] El volumen de dosis de composiciones de las especies objetivo que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de composiciones de cerdos o cochinos, basado en antígenos virales, es generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 ml, y de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml.
- 25 [0074] La eficacia de las vacunas puede probarse aproximadamente de 2 a 4 semanas después de la última inmunización mediante la estimulación de los animales, tales como porcinos, con una cepa virulenta de la gripe porcina. Ambas cepas homólogas y heterólogas se utilizan para la estimulación para probar la eficacia de la vacuna. El animal puede estimularse mediante inyección IM o SC, aerosol, por vía intranasal, intraocular, intratraqueal, y/o por vía oral. Las muestras de las articulaciones, los pulmones, el cerebro y/o la boca pueden ser recogidas antes y después de la estimulación y pueden ser analizadas para la presencia de anticuerpo específico de la gripe porcina.
- 30 [0075] Las composiciones que comprenden las cepas virales atenuadas de la invención utilizadas en los protocolos de sensibilización-refuerzo están contenidas en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la invención protegen al animal de la gripe porcina y/o previenen la progresión de la enfermedad en un animal infectado.
- 35 [0076] Las diversas administraciones se realizan preferiblemente con de 1 a 6 semanas de diferencia. El intervalo de tiempo preferido es de 3 a 5 semanas, y óptimamente 4 semanas de acuerdo con una realización, también se prevé un refuerzo anual. Los animales, por ejemplo, cerdos, pueden tener al menos 3-4 semanas de edad en el momento de la primera administración.
- 40 [0077] Se debe entender por un experto en la técnica que la presente descripción se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a la misma. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, un experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin una gran experimentación.
- 45 [0078] En el presente documento se describe un kit para realizar un procedimiento de provocar o inducir una respuesta inmunológica o de protección contra la gripe porcina en un animal que comprende una composición o vacuna inmunológica de gripe porcina atenuada y las instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.
- 50 [0079] También se describe en el presente documento un kit para realizar un procedimiento de inducir una respuesta inmunológica o protectora contra la gripe porcina en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende una cepa de la gripe porcina atenuada de la invención, e instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.
- 55 [0080] También se describe en el presente documento un kit para la vacunación de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención tal como se describe anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de sensibilización de acuerdo con la presente invención, y un

segundo vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de refuerzo según la presente invención. El kit puede contener ventajosamente primeros o segundos viales adicionales para vacunas de refuerzo adicionales o vacunas de refuerzo adicionales.

5 [0081] Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o un tampón fosfato. Otros portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que facilitan la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención *in vitro*); ventajosamente, el portador, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y los volúmenes de dosis en el presente documento se describen en la descripción general y también pueden ser determinados por el experto en la materia a partir de esta descripción leída en relación con el conocimiento en la técnica, sin una gran experimentación.

10 [0082] Las composiciones y vacunas inmunológicas de acuerdo con la invención puede comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para usar en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros de derivados de alquenilo, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Kliman et al, 1996; WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina o (8) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado en la presente solicitud, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

15 [0083] En una realización, los adyuvantes incluyen aquellos que promueven una mejor absorción a través de revestimientos de la mucosa. Algunos ejemplos incluyen MPL, LTK63, toxinas, micropartículas de PLG y varios otros (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). En una realización, el adyuvante puede ser un quitosano (Van der Lubben et al 2001; Patel et al 2005; Majithiya et al 2008; patente de Estados Unidos No. de serie 5,980.912).

Referencias:

- 35 [0084]
- Abe Y, Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Hongo S. 2004. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J. Virology* 78:9605-9611.
- Altschul SF, Madden TL. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- 40 Bohne-Lang A, von der Lieth CW. 2005. GlyProt: *in silico* glycosylation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 33:W214-219.
- Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. 2008. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study. *Virology J.* 5:40.
- Cai Z, Zhang T, Wan X-F. 2010. A computational framework for influenza antigenic cartography. *PLoS Computational Biology*, 6(10):e 1000949.
- 45 Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31:417-427.
- Cottet R, Rowe CA, Bender BS. 2001. Influenza virus. *Curr. Protoc. Immunol.* 19.11:1-32.
- Das SR, Hensley SE, David A, Schmidt L, Gibbs JS, Puigbò P, Ince WL, Bennick JR, Yewdell JW. 2011. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:E1417-E1422.
- 50 Das SR, Puigbò P, Hensley SE, Hurt DE, Bennick JR, Yewdell JW. 2010. Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain. *PLoS Pathog* 6:e1001211.
- Desselberger U, Nakajima K, Alfino P, Pedersen F, Haseltine W, Hannoun C, Palese P. 1978. Biochemical evidence that "new" influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3341-3345.
- Hause BM, Oleson TA, Stine DL, Bey RF, Simonson RR. 2011. Genetic and antigenic characterization of recent human-like H1 (δ -cluster) swine influenza virus isolates. *J. Swine Health Prod.* 19:268-276.
- 55 Hause BM, Oleson TA, Bey RF, Stine DL, Simonson RR. 2010. Antigenic categorization of contemporary H3N2 swine influenza virus isolates using a high-throughput serum neutralization assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:352-359.
- Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos. T. R. Soc. B.* 356:1861-1870.
- 60 Hensley SE, Das SR, Gibbs JS, Bailey AL, Schmidt LM, Bennick JR, Yewdell JW. 2011. Influenza A virus hemagglutinin antibody escape promotes neuraminidase antigenic variation and drug resistance. *PLoS ONE* 6:e15190.

- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full length amplification of all influenza viruses. *Arch. Virol.* 146:2275-2289.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:6108-6113.
- 5 Karasin AI, Carman S, Olsen CW. 2006. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003-2005). *J. Clin. Microbiol.* 44:1123-1126.
- Long J, Bushnell RV, Tobin JK, Pan K, Deem MW, Nara PL, Tobin GJ. 2011. Evolution of H3N2 influenza virus in a guinea pig model. *PLoS ONE* 6:e20130.
- 10 Lorusso A, Vincent AL, Gramer MR, Lager KM, Ciacchi-Zanella JR. 2012. Contemporary epidemiology of North American lineage triple reassortant influenza A viruses in pigs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Jan. 22 [epub ahead of print].
- Sali A, Potterton L. 1995. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER." *Proteins* 23: 318-326.
- Schild G, Oxford J, Dowdle W, Coleman M, Pereira M, Chakraverty P. 1974. Antigenic variation in current influenza A viruses: evidence for a high frequency of antigenic 'drift' for the Hong Kong virus. *Bull. World Health Organ.* 51:1-11.
- 15 Schulze IT. 1997. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J. Infect. Dis.* 176:S24-S28.
- Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Julkunen I. 2011. Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. *PLoS ONE* 6:e25848.
- Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. 2011. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. *PLoS ONE* 6:e22844.
- 20 Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. 2012. Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PLoS ONE* 7:e32119.
- WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2002
(http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf).
- 25 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Vigerust DJ, Ulett KB, Boyd KL, Madsen J, Hawgood S, McCullers JA. 2007. N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J. Virology* 81:8593-8600.
- 30 Vincent AL, Ma W, Lager KM, Gramer MR, Richt JA, Janke BH. 2009. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes* 39:176-185.
- Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk H-D. 2000. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virology* 74:6316-6323.
- 35 Wanzeck K, Boyd KL, McCullers JA. 2011. Glycan shielding of the influenza virus hemagglutinin contributes to immunopathology in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183:767-773.
- Wei C-J, Boyington JC, Dai K, Houser KV, Pearce MB, Kong W-P, Yang Z, Tumpey TM, Nabel GJ. 2010. Crossneutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci. Trans. Med.* 2:24fa21. doi:10.1126/scitranslmed.3000799. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, George KS, Hatta M, Kawaoka Y, Wentworth DE. 2009. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and swine origin human influenza A viruses. *J. Virology* 83:10309-10313.
- 40 [0085] La invención se describirá a continuación adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS**45 Ejemplo 1 - Construcción de virus de la gripe porcina hiperglicosilados***Materiales/Procedimientos.*

50 [0086] Las muestras clínicas (frotis nasales o tejido pulmonar) se recogieron de cerdos que presentaban síndrome gripe y se sometieron a aislamiento viral y caracterización (pruebas de diagnóstico de rutina). El aislamiento del virus se realizó en células de testículo porcino (ST) cultivadas en DMEM que contenía suero bovino fetal al 5% a 37°C con 5% de CO₂. Para la propagación viral, se omitió el suero bovino de la DMEM. Se propagaron células 293T y MDCK en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%. El ARN se extrajo de los fluidos de recolección del cultivo celular infectado utilizando el kit de aislamiento viral 5x MagMax-96 (Life Technologies).

55 [0087] Los genomas virales completos se amplificaron utilizando un procedimiento de PCR de transcripción inversa multisegmento descrito previamente (Zhou B, et al. 2009). Se prepararon bibliotecas de ADNc virales utilizando el kit de fragmentación rápida de ADN NEBNext y el kit Library Prep Set 4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs), con la excepción de que los adaptadores del kit fueron reemplazados con los adaptadores de código de barras (kit Ion Xpress Adaptor 1-16, Vida Technologies). Se prepararon plantillas de secuenciación de ADN usando el Kit Xpress Template 2.0 (Life Technologies) y se secuenciaron utilizando un Ion Torrent Personal Genome Machine (Life

Technologies). Los cónigos fueron ensamblados utilizando software SeqMan NGen (DNASTAR). Los cónigos que codifican HA de longitud completa se identificaron por análisis BLAST. Las secuencias de ADN de HA de longitud completa fueron alineadas utilizando el procedimiento ClustalW. Se realizaron análisis filogenéticos utilizando MEGA 5.0 utilizando el procedimiento de unión de vecinos y la topología de árbol se verificó con 1000 repeticiones de arranque (Tamura K, et al. 2011). Las secuencias de genes de HA fueron depositadas en Genbank con los números de acceso JQ638655-JQ638665.

[0088] Genética inversa. En el contexto de la biología molecular, "genética inversa" se define como la generación de virus que poseen un genoma derivado de ADNc clonados (para una revisión, véase Neumann et al, J. Gen. Viral, 83: 2635; 2002). En el presente estudio, se utilizó un virus de gripe porcina con casete interno de gen interno de triple intercambio (A/porcino/Carolina del Norte/3793/08 (H1N1)) como plantilla para crear un sistema genético inverso del virus de la gripe porcina con TRIG. Los ocho segmentos se amplificaron por PCR, se digirieron con *Bsm*I y se ligaron en un pHW2000 digerido de manera similar, tal como se ha descrito anteriormente (Hoffmann E, et al. 2001). Los plásmidos que llevan inserto se identificaron mediante digestión por restricción y se secuenciaron para verificar la identidad con A/porcino/Carolina del Norte/3793/08. Los genes de HA y NA (SEQ ID NO: 7 y 11) de 10-0036-2 también se clonaron en pHW2000 (Hoffmann et al 2000, PNAS 97 (11): 6108-6113) y se transfectaron junto con plásmidos que llevaban la polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa ácida (PA), nucleoproteína (NP), matriz (M) y los genes no estructurales (NS) derivados de A/porcino/Carolina del Norte/3793/08 para producir 10-0036-2 derivado de genética inversa (RG 10-0036-2, Figura 1). La mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo en el plásmido que contenía el gen de HA de 10-0036-2 para crear mutantes con 1-5 sitios de glicosilación unidos a N adicionales utilizando el kit de mutagénesis dirigida de sitio Quik Change II (Agilent Technologies) (Tabla 1, Figura 2). Los glicanos se añaden a las proteínas en los residuos de asparagina (N) localizados en el contexto del motivo de glicosilación unido a N de NXS/T, donde N es el aminoácido asparagina, X es cualquier aminoácido, y S/T es serina o treonina.

25 Tabla 1 Sitios de glicosilación unidos a N adicionales modificados en el gen HA de RG10-0036-2 utilizando mutagénesis dirigida de sitio

Número de sitios de glicosilación unidos a N adicionales	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
1	G212A	S71N
2	G212A, G270T	S71N, K90N
3	G212A, G270T, C517-718AC,	S71N, K90N, L173T
4	G212A, G270T, C517-718AC, C859A	S71N, K90N, L173T, P287T
5	G212A, G270T, C517-718AC, C859A, A881C	S71N, K90N, L173T, P287T, K294T

[0089] El rescate de virus recombinantes se realizó como se ha descrito previamente (Hoffmann E, et al. 2000). En resumen, las células 293T y MDCK fueron cocultivadas en Opti-MEM I que contenía 5% de SFB en placas de 6 pocillos con aproximadamente 1×10^6 células de cada 293T y MDCK aproximadamente 18 horas antes de la transfección. Cien nanogramos de cada uno de los ocho plásmidos se agruparon en 100 μ l de Opti-MEM I y se combinaron con 100 μ l de Opti-MEM que contenía 3 μ l de Lipofectamina (Invitrogen) y se incubaron a temperatura ambiente 15 minutos antes de diluirse a 1 ml con Opti-MEM I y se transfirieron a un único pocillo de la placa de 6 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 6 horas antes de que la mezcla de transfección se sustituyó con Opti-MEM I. A las 24 horas después de la transfección, se transfirieron 1,5 ml a una placa de 6 pocillos de células MDCK confluentes y se añadieron 1,5 ml de DMEM que contenían 1 μ g/ml de tripsina tratada con TPCK. Los virus se recogieron el día 5 después de la infección y sus títulos se determinaron mediante el ensayo de HA. Los genes de la HA de los virus rescatados se secuenciaron para verificar la secuencia correcta.

[0090] Resultados. El análisis genético de los sitios de glicosilación unidos a N predichos (NXS/T) encontró sitios en N28, N40, N104, N142, N176, N303, N497 y N556 para el virus de 10-0036-2. Se utilizó mutagénesis dirigida de sitio para añadir un 1-5 sitios de glicosilación unidos a N adicionales a la porción de cabeza globular de HA (tabla 1). Después del rescate del virus del cultivo celular, los virus mutantes se caracterizaron mediante los estudios de crecimiento en células ST. Se realizaron estudios de crecimiento, ya que los virus atenuados a menudo demuestran una disminución de las tasas de crecimiento y los títulos in vitro. Los virus mutantes con 4 o 5 sitios de glicosilación unidos a N adicionales mostraron tales defectos de crecimiento, lo que sugiere que la glicosilación adicional atenuó el virus. Los virus atenuados se evaluaron a continuación en cerdos para evaluar su virulencia in vivo y caracterizar la respuesta inmunitaria contra estos virus mutantes.

50 **Ejemplo 2 - Eficacia de las vacunas de la gripe porcina atenuadas en cerdos**

5 [0091] *Materiales y Procedimientos.* Se separaron sesenta cerdos de buena salud de 3 semanas de vida (SIV seronegativo confirmado por IDEXX FlockChek ELISA) en 4 grupos de 15 en habitaciones separadas. En el día 0 (d0), los cerdos se inocularon por vía intranasal con 2 ml de 6,0 TCID₅₀/ml de virus. El grupo 1 fue falsamente infectado con medio de cultivo celular (DMEM). El grupo 2 recibió 10-0036-2 n + 5. El grupo 3 recibió 10-0036-2 n + 4 (un mutante con 4 sitios de glicosilación adicionales; similar a n + 5, pero que carece de la mutación A881C [K294T]). El grupo 4 recibió 10-0036-2 parental (sin mutaciones) creado por genética inversa. Los cerdos se frotaron con un algodón (nasal) en el día 0 y las muestras se desarrollaron mediante QPCR para la detección de SIV para verificar que no hay infección activa. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Para las Tablas 2 y 3, los grupos con diferentes letras tienen promedios estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). Por ejemplo, "A" es estadísticamente diferente de "B", y "BC" es estadísticamente diferente de "A", pero no "B" o "C".

10

Tabla 2 Estudio de vacunación

Vacunación (H1N2)	Frotis nasal, día 3 (TCID ₅₀ /ml)	Frotis nasal, día 5 (TCID ₅₀ /ml)	Título del pulmón, día 5 (TCID ₅₀ /ml)	Puntuación del pulmón	Puntuación IHC
Control neg.	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
mutante n+ 4	3,1 B	2,8 B	0,9 B	0,0 A	0,0 A
mutante n+5	2,6 C	2,7 B	0,4 C	0,2 A	0,2 A
parental	4,1 D	3,2 C	5,4 B	1,5 B	2,0 B

15 20 [0092] Frotis nasales recogidos en los días 1, 3 y 5. Se sacrificaron cinco cerdos de cada grupo en el día 5 y se recogieron muestras de pulmón. Los frotis del día 1 fueron analizados por QPCR. Los frotis de los días 3 y 5, así como las muestras de pulmón se titularon para SIV. Los pulmones fueron enviados a un laboratorio de la University Diagnostic para el análisis histopatológico e IHC. En el día 21 los cerdos fueron revacunados como anteriormente. Estos resultados demuestran que los mutantes que contienen 4 o 5 sitios de glicosilación unidos a N adicionales se atenúan y son no virulentos en cerdos, de acuerdo con los estudios de crecimiento in vitro. Las titulaciones de los frotis nasales indicaron que el virus era capaz de replicarse in vivo, sin embargo, la ausencia de virus en los pulmones y la falta de daño pulmonar sugieren una replicación limitada al tracto respiratorio superior. Se ha demostrado que las mutaciones en otros genes de la gripe que confieren sensibilidad a la temperatura limitan la infección al tracto respiratorio superior y son la base de la vacuna de la gripe atenuada viva humana FluMist®.

25

30 [0093] En el día 31, los cerdos fueron estimulados con un aislado de campo 12-1110-1 (H3N2). Los resultados del estudio de estimulación se resumen en la Tabla 3. Para la estimulación (realizada de forma comparable a Richt et al 2006, J. Virology 80 (22): 11.009-11.018), se administraron por vía intranasal 2 ml de 4,6 TCID₅₀/ml. La sangre y los frotis nasales se recogieron en el día 31 antes de la estimulación. Los frotis nasales se recogieron en los días 0 y 1, y se analizaron por QPCR. Los frotis nasales se recogieron en los días 3 y 5 y el título de SIV de determinó por titulación. Todos los cerdos fueron sacrificados en el día 5 y las muestras de pulmón fueron analizadas por titulación. Las muestras de pulmón se analizaron como anteriormente.

35 Tabla 3. Estudio de estimulación

Estimulación H3N2	Frotis nasal, día 3 (TCID ₅₀ /ml)	Frotis nasal, día 5 (TCID ₅₀ /ml)	Título del pulmón, día 5 (TCID ₅₀ /ml)	Puntuación del pulmón	Puntuación IHC
Control neg.	5,4 A	5,8 A	3,0 A	1,6 A	1,5 A
mutante n+ 4	2,3 B	0,7 B	0,0 B	0,0 B	0,0 B
mutante n+5	2,9 BC	1,8 C	0,1 B	0,0 B	0,0 B
parental	0,5 C	0,9 BC	0,0 B	0,0 B	0,0 B

40 [0094] Estos resultados demuestran que los cerdos vacunados con mutantes n + 4 o n + 5 fueron protegidos de la enfermedad, como es evidente por la falta de virus en los pulmones por valoración e IHC, así como por la falta de evidencias de lesiones pulmonares. Los cerdos sin tratar (control negativo) fueron infectados fácilmente con el virus de estimulación H3N2 y mostraron una enfermedad de la gripe clásica. Los cerdos previamente infectados con el virus parental 10-0036-2 también estaban protegidos de la estimulación con H3N2.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 [0095]
<110> Merial Limited

Hause, Ben

	<120>	Vacunas atenuadas de la gripe porcina y procedimientos de fabricación y uso de las mismas	
5	<130>	MER 12-202P	
	<160>	30	
10	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	2277	
	<212>	ADN	
15	<213>	Virus de la gripe A	
	<400>	1 atggagagaa taaaagaact aagagatctg atgtcgca tg ctgcactcg cgagataactc	60
20		acaaggacca ctgtggacca tatggccata atcaaaaagt acacatcagg aaggcaagag aagaaccccg cactcagaat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagac	120
		aagagaataa tggacatgat tccagagagg aatgaacaag gacaaaccct ctggagcaa aacaacgatg ctggatcga ccgtgtgatg gtatcacccc tggccgtaac atggtggat	180
25		300 agaatggcc caacaacaag cacagttcac taccctaagg tatataaaac ttatttcgaa	240
30		360 aagatcgaaa ggttaaaaca tggtatctt ggccctgtcc acttcagaaa tcaagttaaa ataagaagga gggttgacac aaaccctggg catgcagatc tcagtgccaa ggaggcacag	420
		480 gatgtgatca tggaatgttgt tttcccaa at gatgtgatca tggaatgttgt tttcccaa gaagtgggg caagagtact gacgtcagag tcacagctga caataacaaa ggaaaagaaaa gaagagctcc aggattgtaa gattgctccc	540
35		600 ctgatggtgg catacatgct agaaagagag ttggatcgca agacgagg ttggatcgca agacgagg ttggatcgca agacgagg tctccggtg	660
40		660 gctggtgaa caagcagtgt ttatattgaa gtgctacact taactcaggg aacatgctgg gaacaaatgt acactccagg aggagaagtg agaaatgatg atgttgacca aagtttGatt atcgctgcta gaaacatagt aagaagagca gcagtgtcag cagaccatt agcatctctc	720
		780 ttggaaatgt gccacagcac acagattgga ggaataagga tggatggacat ctttagacag aacccaacgg aggaacaagc ctagacata tgcaaggcag caatggggct gaggattagc	840
45		960 tcttcttca gctttggtgg gttcaccttc aaaagaacaa gcggatcatc agttaagaaa gaagaagaag tgctcacggg caacctccaa acactgaaaa taagagtaca tgaaggat gaagaattca caatggtagg gagaagagca actgctattc tcagaaaagc aaccaggaga	1020
		1080 ttgatccagt taatagtaag tgggagagac gatcaatcaa ttgctgaggc aataattgt gccatggtat tttcacaaga ggattgcatt atcaaggcag ttagggcga tctgaacttt	1140
55		1260 gtcaataggg caaaccagcg actgaatccc atgcaccaac tcttgaggca tttccaaaaa gatgcaaaag tgctttcca gaactgggaa attgaaccca tcgacagtgt gatggaaatg	1200
60		1320 1380	

	atcgggatat tgcctgatat gacccaagc acggaaatgt cgctgagagg tataagagtc	1440
	agcaaaaatgg gagtagatga gtattccagc acggagagag tggtagttag cattgaccga	1500
5	ttttgagag ttcggatca acgagggAAC gtactattgt cccccgaaga ggtcagcgag	1560
	acacaaggaa ctgagaaatt gacaataact tattcgcat caatgatgtg ggagatcaat	1620
10	ggtcctgagt cagtgcgtgt caacacttat caatggatca taaggaattt ggaaagcttggaaattcaat ggtcacaaga tcccacgatgttataacaaca aaatggaaatt tgaaccattc	1680
	cagtctcttg tccctaaggc aaccagaagt cgttacagtg gattcgttag gacactgttc	1740
15	cagcaaatgc gggatgtgct tggAACACATT gacactgtcc aaataataaa acttctcccc	1800
	tttgctgctg ctccaccgga acagagtagg atacagttct cctcgctgac tgtgaatgtg	1860
20	agaggatcag ggctgaggat actggtaaga ggcaattctc cagtgttcaa ttacaacaaa	1920
	gcaaccaaaa ggcttacaat tcttgaaaaa gatgcagggtg cattgactga agatccagat	1980
	gaaggcacag ctggagtggc gtctgctgtc ctgagggat tcctcatttt gggtaaagaa	2040
25	gacaagagat atggcccAGC attaagcatc aatgaactga gcaatcttc AAAAGGGAGAG	2100
	aaggctaattg tgttaattgg gcaaggagac gtgggtttgg taatgaaacg gaaacggAAC	2160
	tctagcatac ttactgacag ccagacagcg accaaaagaa ttcggatggc catcaat	2220
30		2277
	<210> 2	
	<211> 759	
	<212> PRT	
35	<213> Virus de la gripe A	
	<400> 2	
40	Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr	
	1 5 10 15	
	Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys	
	20 25 30	
45	Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys	
	35 40 45	
50	Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met	
	50 55 60	
55	Asp Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys	
	65 70 75 80	
60	Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val	
	85 90 95	
	Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Val His Tyr Pro	

ES 2 662 022 T3

	100	105	110
5	Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Ile Glu Arg Leu Lys His Gly 115 120 125		
10	Ile Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg 130 135 140		
15	Val Asp Thr Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln 145 150 155 160		
20	Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Val 165 170 175		
25	Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu 180 185 190		
30	Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu 195 200 205		
35	Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr 210 215 220		
40	Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp 225 230 235 240		
45	Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Val Asp 245 250 255		
50	Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Ala Val 260 265 270		
55	Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275 280 285		
60	Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Arg Gln Asn Pro Thr Glu 290 295 300		
65	Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305 310 315 320		
70	Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser 325 330 335		
75	Ser Val Lys Lys Glu Glu Glu Val Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu 340 345 350		

ES 2 662 022 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 662 022 T3

	Thr	Phe	Asp	Thr	Val	Gln	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Ala	Ala
5																
	610					615						620				
	Pro	Pro	Glu	Gln	Ser	Arg	Ile	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Val
10																
	625				630						635					640
	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Phe
15																
	645								650						655	
	Asn	Tyr	Asn	Lys	Ala	Thr	Lys	Arg	Leu	Thr	Ile	Leu	Gly	Lys	Asp	Ala
20																
	660					665								670		
	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Pro	Asp	Glu	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Glu	Ser
25																
	675				680									685		
	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Lys	Glu	Asp	Lys	Arg	Tyr
30																
	690				695									700		
	Gly	Pro	Ala	Leu	Ser	Ile	Asn	Glu	Leu	Ser	Asn	Leu	Ala	Lys	Gly	Glu
35																
	705				710									715		720
	Lys	Ala	Asn	Val	Leu	Ile	Gly	Gln	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Val	Met	Lys
40																
	725							730						735		
	Arg	Lys	Arg	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Thr	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Thr	Lys
45																
	740						745							750		
	Arg	Ile	Arg	Met	Ala	Ile	Asn									
50																
	755															
	<210>	3														
55	<211>	2271														
	<212>	ADN														
	<213>	Virus de la gripe A														
	<400>	3														
60	atggatgtca	acccgactct	acttttccta	aagggttccag	cgcaaaatgc	cataagcacc										60
	acattccctt	atactggaga	tcctccatac	agccatggaa	caggaacagg	atacaccatg										120
	gacacagtca	acagaacaca	ccagtattca	aaaaaaggga	aatggacgac	aaacacagag										180
	actggggcac	cccagctcaa	cccgattgat	ggaccactac	ccgatgataa	tgaaccaagt										240
	gggttatgcac	aaacagactg	tgtcctggag	gccatggctt	tccttgaaga	atccccacca										300
	gggatatttg	agaattcatg	ccttgaaaca	atggaaattg	tccaacaaac	aagggtggat										360
	aaactaactc	aaggtcgcca	gacttatgat	tggacattaa	acagaaatca	accggcagca										420
	actgcattgg	ccaacaccat	agaagttttt	agatcaaacg	gtctaacagc	taatgagtca										480

	ggaaggctaa tagattcct aaaggatgt aatggaaatcaa tggataagga ggaaatagag	540
	ataacaacac attttcaaag aaaaaggaga gtaagagaca acatgaccaa gaagatggtc	600
5	acacaaagaa caatagggaa gaaaaaacaa aaattgaata agagaagtta tctaataaga	660
	gcactgacat tgaatacgat gaccaaagat gcagagagag gcaagttaa aaggaggcgt	720
10	atcgcaacac ctgggatgca gatttagaggg ttcgtgtact ttgttgagac tttagctaga	780
	agcatctgctgaaaagcttga acagtccgga ctcccagttag ggggcaatga aaagaaaagcc	840
	aaattggcaa atgttgcgaa agatgtatg actaattcac aagacacaga gctttcttc	900
15	acaatcactg gagataaacac taaatggaat gaaaaccaga atcctcgaat gttcctggcg	960
	atgatcacat acattaccag aaatcaaccc gagtggttca gaaacatact ggtatggca	1020
20	ccaataatgt tctcaaacaa aatggcaaga ctagggaaag ggtacatgtt cgagagtaaa	1080
	agaatgaagc tccgaacaca ggtaccagca gaaatgttag caagcattga tcttaagtat	1140
	ttcaatgaat caacaaggaa gaaaattgag aaaataaggc ctctcctaata agatggcaca	1200
25	gcatcattga gccctggat gatgatgggc atgttcaaca tgctaagtac gggtttggga	1260
	gtctcaatac tgaatcttgg acaaaagaaa tacaccagga caacatactg gtggatggaa	1320
30	ctccaaatcct cagacgattt tgccctcata gtaaatgcac caaatcatga gggaaatacaa	1380
	gcaggagtgg atagattcta caggacctgc aagtttagtag ggatcaacat gagaaaaag	1440
	aagtccctata taaataagac tgggacattt gaattcacaa gctttttta tcgctatggg	1500
35	ttttagctta atttttagcat ggagctgcc agtttggag tgtctggat aaacgaatca	1560
	gctgatgtga gcatcgagt aacagtgata aagaacaaca tgataaataa tgatcttggaa	1620
40	cctgcaacag cccagatggc cctccagttt ttcatcaaag actacagata cacatataga	1680
	tgccatagag gggacacaca aatccagacg agaagatcat tcgagctaa gagcctgtgg	1740
	aatcaaactc aatcaaaggc aggattatta gtatctgatg gaggacaaa tttatacaat	1800
45	atccggaaatc ttcacattcc tgaagtctgc taaaatggg agctaatgga tgaggattat	1860
	cggggaaagac tttgtaatcc cctgaatccc tttgtcagcc ataaagagat tgattctgtaa	1920
50	aacagtgctg tggtgatgcc agccccatggt ccagccaaaa gtatggagta tgatgccgtt	1980
	gcaactacac actcctggat tcccaagagg aaccgctcta ttctcaacac aagccaaagg	2040
	ggaattcttggatggatgaaca gatgtaccag aagtgcgtca acctgttcga gaaatttttc	2100
55	ccttagtagtt catacagaag accagttgga atttcttagca tggtgaggc catggtgtct	2160
	aggccccggatgtatgccag gattgacttc gagtctggac ggattaagaa agaagagttc	2220
	tctgagatca tgaagatctg ttccaccatt gaagaactca gacggcaaaa g	2271

<210> 4
<211> 757

<212> PRT
 <213> Virus de la gripe A
 5 <400> 4
 Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15
 10 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30
 15 Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45
 20 Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Thr Gly Ala Pro
 50 55 60
 25 Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Asp Asp Asn Glu Pro Ser
 65 70 75 80
 30 Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
 85 90 95
 35 Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
 100 105 110
 40 Ile Val Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
 115 120 125
 45 Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
 130 135 140
 50 Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ala Asn Glu Ser
 145 150 155 160
 55 Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asp Lys
 165 170 175
 60 Glu Glu Ile Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
 180 185 190
 65 Asp Asn Met Thr Lys Lys Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
 195 200 205
 70 Lys Gln Lys Leu Asn Lys Arg Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Leu Thr Leu
 210 215 220
 75 Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
 225 230 235 240

ES 2 662 022 T3

	Ile	Ala	Thr	Pro	Gly	Met	Gln	Ile	Arg	Gly	Phe	Val	Tyr	Phe	Val	Glu	
5						245				250						255	
	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Leu	Pro	
						260			265						270		
10																	
	Val	Gly	Gly	Asn	Glu	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Val	Val	Arg	Lys	
						275			280						285		
15																	
	Met	Met	Thr	Asn	Ser	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Phe	Thr	Ile	Thr	Gly	
						290			295								
20																	
	Asp	Asn	Thr	Lys	Trp	Asn	Glu	Asn	Gln	Asn	Pro	Arg	Met	Phe	Leu	Ala	
						310					315					320	
25																	
	Met	Ile	Thr	Tyr	Ile	Thr	Arg	Asn	Gln	Pro	Glu	Trp	Phe	Arg	Asn	Ile	
						325				330					335		
30																	
	Leu	Ser	Met	Ala	Pro	Ile	Met	Phe	Ser	Asn	Lys	Met	Ala	Arg	Leu	Gly	
						340				345					350		
35																	
	Lys	Gly	Tyr	Met	Phe	Glu	Ser	Lys	Arg	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Val	
						355			360						365		
40																	
	Thr	Arg	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Arg	Pro	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Thr	
						385				390					400		
45																	
	Ala	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Met	Met	Met	Gly	Met	Phe	Asn	Met	Leu	Ser	
						405				410					415		
50																	
	Thr	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Gly	Gln	Lys	Lys	Tyr	Thr	
						420				425					430		
55																	
	Arg	Thr	Thr	Tyr	Trp	Trp	Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Asp	Asp	Phe	Ala	
						435			440						445		
60																	
	Leu	Ile	Val	Asn	Ala	Pro	Asn	His	Glu	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Val	Asp	
						450			455						460		
	Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr	Cys	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Met	Ser	Lys	Lys	
						465			470						480		
	Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Lys	Thr	Gly	Thr	Phe	Glu	Phe	Thr	Ser	Phe	Phe	

ES 2 662 022 T3

	485	490	495
5	Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe 500 505 510		
10	Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr 515 520 525		
15	Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala 530 535 540		
20	Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg 545 550 555 560		
25	Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu 565 570 575		
30	Lys Ser Leu Trp Asn Gln Thr Gln Ser Lys Ala Gly Leu Leu Val Ser 580 585 590		
35	Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu 595 600 605		
40	Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Arg Gly Arg Leu 610 615 620		
45	Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Asp Ser Val 625 630 635 640		
50	Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu 645 650 655		
55	Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg 660 665 670		
60	Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met 675 680 685		
65	Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser 690 695 700		
70	Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser 705 710 715 720		
75	Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys 725 730 735		

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

5 Leu Arg Arg Gln Lys
 755

10	<210> 5 <211> 2148 <212> ADN <213> Virus de la gripe A	
15	<400> 5 atggaagact ttgtgcgaca atgcttcaat ccaatgatcg tcgagcttgc ggaaaaggca atgaaagaat atggagaaga tccgaaaatt gaaactaaca aattcgctgc aatatgcaca	60 120
20	cacttggaaat tatgtttcat gtattcagat ttccatttca ttgacgagcg gggtgaatca atcatttgtat aatctggtga tccaaatgca ttactgaagc accgatttga gataattgaa	180 240
25	ggacgagacc ggaccatggc ctggacagta gtgaacagta tctgcaacac cacagggta gagaagccta aatttcttcc ggatttatac gactacaagaaaatcggtt cattgaaatt	300 360
30	ggagtgacac gaagggaggt ccacatatac tacctagaga aagccaacaa aataaaatcc gagaagacac acattcacat ttttcatttc actggagagg agatggccac caaagcagac	420 480
35	tacacccttg atgaagaaag cagggcaaga atcaaaacca ggctttcac cataagacaa gaaatggcaa gttagggct atgggattcc tttcgtcagt ccgaaagagg cgaggagaca	540 600
40	attgaagaaa gattgaaat tacaggaacc atgcgcagac ttgccgacca aagtctccc ccgaacttct ccagtcttga aaactttaga gcttatgtat atgggatcga accaaacggc	660 720
45	tgcattgagg gcaagcttcc tcaaattgtca aaagaagtga gcgcaccaat tgaacccttc ttgaagacaa caccacgccc tctaaaatttgc cctgatggc ctccttgctc tcagcggtca	780 840
50	aagttcttgc tgatggatgc tctgaaacta agtattgaag acccgagtc tgaaggagaa ggaataaccac tatatgtatgc aatcaagtgc atgaagacat ttttggctg gaaagaaccc	900 960
55	aacataatca aaccacatga gaaaggcata aaccccaatt acctactggc ttggaaagcag gtgctagcag agctccaaga cattgaaaat gaagagaaga tcccaaagac aaagaacatg	1020 1080
60	aggagaacaa gccaaattgaa gtgggcactc ggtgagaata tggcaccaga gaaagtagat tttgatgact gcaaagatgt tggatgatctt aaacagtatg acagcgacga gccagagccc agatctctag caagttgggt caaaaatgaa ttcaacaagg catgtgaatt gaccgattca agctggatag aacttgcata gataggagaa gatattgcac cgattgaaca catcgcaagt	1140 1200
	atgaggagga actatttac agcagaagtgc tcccatgtt gggctacgga atacataatg aagggagtgt acataaacac ggcttgctt aatgcatttgc gtgcagccat ggatgacttt cagctgatcc caatgataag caaatgcagg accaaagaag gaagacgaaa aacaaatctg	1380 1440
		1500

	tatgggttca ttataaaaagg aaggtcccat ctgaggaatg atactgacgt ggtgaacttt	1560
5	gtaagcatgg agttctccct caccgaccgg agactggagc cacacaaatg ggaaaaatac	1620
	tgtgttcttg aaataggaga catgctcctg aggactgcga taggccaagt gtcgaggccc	1680
	atgttcttat atgtgagaac caatggaacc tccaagatca agatgaaatg gggcatggaa	1740
10	atgaggcgct gccttcttca atctcttcag cagattgaga gcatgattga ggctgagtct	1800
	tctgtaaaag agaaagacat gaccaaggaa tttttgaaa acaaatcggaa aacatggcca	1860
15	attggagaat cacccaaagg agtggaggaa ggctctattg ggaaagtgtg caggacctta	1920
	ctggcaaaat ctgtattcaa cagtctatac gcgtctccac aacttgaggg atttcggct	1980
	aatcgagaa agttgcttct cattgttcag gcacttaggg acaacctgga acctggaacc	2040
20	ttcgatcttggggctata tgaagcaatc gaggagtgcc tgattaatga tccctgggtt	2100
	ttgcttaatg catcttggtt caactccttc ctcacacatg cactgaaa	2148
25	<210> 6 <211> 716 <212> PRT <213> Virus de la gripe A	
30	<400> 6	
	Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu	
	1 5 10 15	
35	Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asp Pro Lys Ile Glu Thr	
	20 25 30	
40	Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr	
	35 40 45	
45	Ser Asp Phe His Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ser Ile Ile Val Glu	
	50 55 60	
50	Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu	
	65 70 75 80	
	Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn	
	85 90 95	
55	Thr Thr Gly Val Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr	
	100 105 110	
60	Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His	
	115 120 125	

ES 2 662 022 T3

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

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

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

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

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

20 Gly Thr Met Arg Arg Leu Ala Asp Gln Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
 210 215 220

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

30 Cys Ile Glu Gly Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Ser Ala Gln
 245 250 255

35 Ile Glu Pro Phe Leu Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Leu Pro Asp
 260 265 270

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

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

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

50 Asn Ile Ile Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Leu
 325 330 335

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

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

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

ES 2 662 022 T3

Lys Asp Val Gly Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Pro
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 662 022 T3

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

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

 15 Arg Asp Asn Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685

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

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

 30 <210> 7
 <211> 1692
 <212> ADN
 <213> virus de la gripe A

 35 <400> 7
 atgaaggcaa tactagtagt cctgctatat acatttacaa ccgcaaatgc cgacacatta 60
 tgcataggtt atcatgcgaa caattcaact gacaccgtag acacagtgt agaaaaaaaat
 gtaacagtaa cacactctgt caaccttcta gaaaacaggc ataatggaa actatgtaaa 120

 40 ctaagagggg tagctccatt gcattttgggt aaatgtaaaca ttgctggctg gctcctggaa
 aatccagagt gtgagtc当地 ctccaaagca agctcatggc cttacattgt ggaaacatct
 aattcagaca atgggacgtg ttacccagga gatttcatca attatgagga gctaagagag 180
 cagttgagct cagtgtcatc atttgaaaga tttgagatat tccccatgac aagttcatgg
 cccaatcatg acacgaacag aggtgtgacg gcagcatgtc ctcacgctgg gacaaatagc 240

 45 ttctacaaaa atttaatatg gctggtaaaa aaaggaaatt catacccaa gatcaacaaa
 tcctacatta acaacaaaaga gaaagaagtt ctcgtctat gggccatata tcattcacct
 accaatgccg accaacaag cctctaccaa aatgcagatg cctatgttt tgtgggtca 300

 50 tcaagatata gcaggaagtt cgagccagaa atagcaacaa gacccaaaggat gagagaccaa
 gcagggagaa tgaactatta ctggacattt gtagagcctg gagacaagat aacattcgaa 360

 55 gcaactggaa atcttagtggt accgagatat gccttcgcata tgaaaagaaa ttctggatct
 ggtattatca tttcagatac atcagtccac gattgtgata cgacttgtca gacacccaaat
 ggtgctataa acaccagcct cccatattcaa aatatacatc cagtcacaat tggagaatgt 420

 60 ccaaaatatg taaaaagtac taaaactgaga atggccacag gattaaggaa tatccgtct
 attcaatcta gaggcctgtt tggggccatt gctggcttta ttgaaggggg ctggacagga 480

 65 27

	atgatagacg gatggcacgg ttaccaccat caaaatgagc agggatcagg atatgcagcc	1140
5	gacctgaaaa gcacacagaa tgccattgac gggatcacta acaaggtaaa ttctgttatt	1200
	gaaaagatga acacacaatt cacagcagta ggttaagagt tcagccactt ggaaagaaga	1260
	atagagaatt taaataaaaaa ggttgatgat ggtttctag atatggac ttacaatgcc	1320
10	gaactgttgg ttctgttgg aaatgaaaga actttggatt accacgattc aaatgtgaaa	1380
	aacttatatg aaaaagtaag aagccaacta aaaaacaatg ccaaagaaat tggaaatggc	1440
15	tgcttgaat tttaccacaa atgtgatgac acgtgtatgg aaagcgtcaa aaatggact	1500
	tatgattacc caaaatactc agaggaagca aaactaaaca gagagggaaat agatgggta	1560
	aagttggaat caacaagggt ttaccaaatt ttggcgatct attcaacggt cgccagttca	1620
20	tttgtactgg tagtctccct gggggcaatc agtttctgga tgtgctctaa tgggtcgcta	1680
	cagtgcagaa ta	1692
25	<210> 8 <211> 564 <212> PRT <213> Virus de la gripe A	
30	<400> 8	
	Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Asn	
	1 5 10 15	
35	Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr	
	20 25 30	
40	Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn	
	35 40 45	
45	Leu Leu Glu Asn Arg His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val	
	50 55 60	
50	Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly	
	65 70 75 80	
	Asn Pro Glu Cys Glu Ser Ile Ser Lys Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile	
	85 90 95	
55	Val Glu Thr Ser Asn Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe	
	100 105 110	
60	Ile Asn Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe	
	115 120 125	

ES 2 662 022 T3

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Met Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140

5 Thr Asn Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Thr Asn Ser
 145 150 155 160

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

15 Lys Ile Asn Lys Ser Tyr Ile Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

20 Leu Trp Ala Ile His His Pro Pro Thr Asn Ala Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

25 Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
 210 215 220

30 Arg Lys Phe Glu Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

35 Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 245 250 255

40 Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270

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

50 Val His Asp Cys Asp Thr Thr Cys Gln Thr Pro Asn Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

55 Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320

60 Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

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

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

65 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380

ES 2 662 022 T3

	Thr Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile		
385	390	395	400
5	Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Ser His		
405	410	415	
10	Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe		
420	425	430	
15	Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn		
435	440	445	
20	Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu		
450	455	460	
25	Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly		
465	470	475	480
30	Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Thr Cys Met Glu Ser Val		
485	490	495	
35	Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu		
500	505	510	
40	Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Val Tyr		
515	520	525	
45	Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val		
530	535	540	
50	Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu		
545	550	555	560
55	Gln Cys Arg Ile		
50	<210> 9		
	<211> 1512		
	<212> ADN		
	<213> Virus de la gripe A		
55	<400> 9 atgagtgaca tcgaagccat ggcgtctcaa ggcaccaaac gatcatatga acaaatggag	60	
	actggtgtg aacgccagga tgcccacagaa atcagagcat ctgtcgaaag aatgatttgt	120	
60	ggaatcgaaa aattctacat ccaaatgtgc actgaactca aactcagtga ctatgaggaa	180	
	cgactaatcc aaaatagcat aacaatagag agaatggtgc tctctgcttt tgatgagaga	240	

	agaataataat acctagaaga gcattccagt gctggaaag accctaagaa aactggagga	300
	cccatatatata gaagagtaga cgaaaagtgg atgagagaac tcatttttgc tgacaaagaa	360
5	gaaataagga gagttggcg ccaggcaaac aatggtgatg atgcaacagc tggcttact	420
	catatcatga tttggcatttc caatctgaat gatgccacgt accagagaac aagagcattt	480
10	gttcgcacccg gaatggatcc cagaatgtgc tctctaattgc aaggttcaac acttcccaga	540
	aggctggag cagcaggtgc tgcagtgaaa ggagttggaa caataacaat ggaattaatc	600
	agaatgatca aacggggat caatgaccga aatttctgga gaggtgaaaa tggaagaagg	660
15	acaaggattt catatgaaag aatgtgcaat attctcaaag gaaaatttca gacagctgcc	720
	caaaggccaa tcatggatca agtgagagaa agtcggaacc cagggAACgc tgagattgaa	780
20	gatctcattt tcctggcacg gtcagcactt atcctaaggg gatcagttgc acataagtct	840
	tgcctgcctg cttgcgtgta tgggcttgca gtggcaagtg ggcatgactt tgaaaggaa	900
	gggtattcgc tggtcggat agacccattt aaattactcc agaacagtca agtgttcagc	960
25	ctggtaagac caaatgaaaa cccagctcac aagagtcaat tagtgtggat ggcattgccac	1020
	tctgctgcat ttgaggatct aagggtctca agttcataa gagggaaagaa agtgattcca	1080
	agggaaagc tttccacaag aggggttcag attgcttcaa atgagaatgt ggaagccatg	1140
30	gattccaata ctttagagct gagaagcaga tactggcttaa taaggaccag aagtggagga	1200
	aatactaatac aacagaaagc atccgcaggc cagatcagtg tgcaacctac attctcagtg	1260
35	caacggaaatc tccctttga aagagcaacc gttatggcag ctttcagcgg aaacaatgaa	1320
	ggacggacat ccgatatgcg gacagaaatt ataaggatga tggaaaatgc aaaaccagaa	1380
	gatttgtcct tccagggcg gggagtcttc gagctctcgg acgaaaaggc aacgagcccg	1440
40	atcgtgcctt ctttgacat gagtaatgaa gggctttatt tcttcggaga caatgcagag	1500
	gagtatgaca gt	1512
45	<210> 10	
	<211> 504	
	<212> PRT	
	<213> Virus de la gripe A	
50	<400> 10	
	Met Ser Asp Ile Glu Ala Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr	
	1 5 10 15	
55	Glu Gln Met Glu Thr Gly Gly Glu Arg Gln Asp Ala Thr Glu Ile Arg	
	20 25 30	
60	Ala Ser Val Gly Arg Met Ile Gly Gly Ile Gly Lys Phe Tyr Ile Gln	
	35 40 45	

ES 2 662 022 T3

	Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln
5	50 55 60
	Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg
	65 70 75 80
10	Arg Asn Lys Tyr Leu Glu Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys
	85 90 95
15	Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg Val Asp Gly Lys Trp Met Arg
	100 105 110
20	Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys Glu Glu Ile Arg Arg Val Trp Arg Gln
	115 120 125
	Ala Asn Asn Gly Asp Asp Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Ile Met Ile
	130 135 140
25	Trp His Ser Asn Leu Asn Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu
	145 150 155 160
30	Val Arg Thr Gly Met Asp Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser
	165 170 175
35	Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val
	180 185 190
40	Gly Thr Ile Thr Met Glu Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn
	195 200 205
	Asp Arg Asn Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala
	210 215 220
45	Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala
	225 230 235 240
50	Gln Arg Ala Met Met Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn
	245 250 255
55	Ala Glu Ile Glu Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu
	260 265 270
60	Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly
	275 280 285
	Leu Ala Val Ala Ser Gly His Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
	290 295 300

ES 2 662 022 T3

	Val	Gly	Ile	Asp	Pro	Phe	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Val	Phe	Ser
5	305					310				315					320	
	Leu	Val	Arg	Pro	Asn	Glu	Asn	Pro	Ala	His	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Trp
10		325						330							335	
	Met	Ala	Cys	His	Ser	Ala	Ala	Phe	Glu	Asp	Leu	Arg	Val	Ser	Ser	Phe
15		340						345							350	
	Ile	Arg	Gly	Lys	Lys	Val	Ile	Pro	Arg	Gly	Lys	Leu	Ser	Thr	Arg	Gly
20		355					360								365	
	Val	Gln	Ile	Ala	Ser	Asn	Glu	Asn	Val	Glu	Ala	Met	Asp	Ser	Asn	Thr
25		370				375						380				
	Leu	Glu	Leu	Arg	Ser	Arg	Tyr	Trp	Ala	Ile	Arg	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly
30		385				390					395				400	
	Asn	Thr	Asn	Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Val	Gln	Pro
35		405						410							415	
	Thr	Phe	Ser	Val	Gln	Arg	Asn	Leu	Pro	Phe	Glu	Arg	Ala	Thr	Val	Met
40		420				425								430		
	Ala	Ala	Phe	Ser	Gly	Asn	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Ser	Asp	Met	Arg	Thr
45		435					440								445	
	Glu	Ile	Ile	Arg	Met	Met	Glu	Asn	Ala	Lys	Pro	Glu	Asp	Leu	Ser	Phe
50		450				455						460				
	Gln	Gly	Arg	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Ser	Asp	Glu	Lys	Ala	Thr	Ser	Pro
55		465				470					475				480	
	Ile	Val	Pro	Ser	Phe	Asp	Met	Ser	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr	Phe	Phe	Gly
60		485						490							495	
	Asp	Asn	Ala	Glu	Glu	Tyr	Asp	Ser								
				500												
	<210>	11														
	<211>	1407														
	<212>	ADN														
	<213>	Virus de la gripe A														
	<400>	11														
	atgaatacaa	atcaaagaat	aataaccatt	gggacagttt	gtctgatagt	tggaaaattt										60
	agtctattgt	tacagatagg	aaacatggtt	tcgttatgga	tcagccattc	aattcagact										120

	gaaggaaaa atcatactga gatgtgcaat caaaatgtca ttacatatgt aaataacaca	180
5	tgggtgaacc gaacttatgt aaacattagc aataccaaaa ttgttaatgt acaggacgtg	240
	gtttcagtaa tattaaccgg caattcctct ctctgccaa taagtgggtg ggctatatac	300
	agcaaagaca atagcataag gattggttct aaagggaca ttttgtcat aagagaacca	360
10	ttcatttcat gctctcactt ggaatgcaga acttttttc tgacccaagg cgcttgctg	420
	aatgacaagc attctaattgg aaccgtcaag gacaggagtc cctatagaac tttaatgagc	480
15	tgtcccatcg gtgaagctcc atctccatat aactcaaggt tcgaatcagt tgcttggta	540
	gcaagtgcatt gccatgatgg gatggatgg ctaacaatcg gaatctccgg tccagataat	600
	ggagcagtag ctgtttaaa atacaacggt ataataacag atacaataaa aagttggaga	660
20	aacaaaatat taagaacaca agagtcagaa tgtgtttgtt tgaacggttc ttgtttact	720
	gtatttaactg atggcccaag caatgggcaa gcatcgataa aatattcaa gatggaaaaa	780
25	ggaaaaataa ttaaatcaat tgagctggat gcacccattt accactatga ggaatgctcc	840
	tgttatcctg atgcaggcaa agtaatgtgt gtttgcagag acaactggca tgcctcgaac	900
	cggccatggg tctcttcga tcagaatctt aattatcaaa tagggtacat atgcagtgg	960
30	gttttcgggt ataaccgcg ttctaatgat ggaaaggca attgtggccc agtacattct	1020
	aatggagcaa atggagtgaa aggattctca tataaatatg gtaatgggtt ttggatagga	1080
35	aggactaaaa gatatcaactc cagaagtggaa tttgaaatgat tttggatcc aaatgggtgg	1140
	actggaaactg atagtagttt ctctatgaag caggatatta tagcattaac tgattggta	1200
	ggatacagtg gaagtttgc ccaacatcctt gaattaacag gaatgaattt cataaggccc	1260
40	tgtttctggg tagaattaaat cagagggcaa cccaggaaa acaccatctg ggctagcgaa	1320
	agcagcatct ctttctgtgg tgtaaatggt gaaaccgcaa gctggtcattt gccagacggaa	1380
	gctgatctgc cattcaccat tgacaag	1407
45	<210> 12	
	<211> 469	
	<212> PRT	
50	<213> Virus de la gripe A	
	<400> 12	
55	Met Asn Thr Asn Gln Arg Ile Ile Thr Ile Gly Thr Val Cys Leu Ile	
	1 5 10 15	
	Val Gly Ile Ile Ser Leu Leu Leu Gln Ile Gly Asn Met Val Ser Leu	
	20 25 30	
60	Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Thr Glu Gly Lys Asn His Thr Glu Met	
	35 40 45	

ES 2 662 022 T3

Cys Asn Gln Asn Val Ile Thr Tyr Val Asn Asn Thr Trp Val Asn Arg
 50 55 60

5 Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Lys Ile Val Asn Val Gln Asp Val
 65 70 75 80

10 Val Ser Val Ile Leu Thr Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly
 85 90 95

15 Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly
 100 105 110

20 Asp Ile Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu
 115 120 125

25 Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His
 130 135 140

30 Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser
 145 150 155 160

35 Cys Pro Ile Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser
 165 170 175

40 Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Met Gly Trp Leu Thr
 180 185 190

45 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr
 195 200 205

50 Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Lys Ile Leu
 210 215 220

55 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Met Asn Gly Ser Cys Phe Thr
 225 230 235 240

60 Val Leu Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe
 245 250 255

65 Lys Met Glu Lys Gly Lys Ile Ile Lys Ser Ile Glu Leu Asp Ala Pro
 260 265 270

70 Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Lys Val
 275 280 285

75 Met Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Ala Ser Asn Arg Pro Trp Val

ES 2 662 022 T3

	290	295	300	
5	Ser Phe Asp Gln Asn Leu Asn Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly 305 310 315 320			
10	Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Ser Asn Asp Gly Lys Gly Asn Cys Gly 325 330 335			
15	Pro Val His Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Lys 340 345 350			
20	Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Asn Ser Arg 355 360 365			
25	Ser Ser Phe Ser Met Lys Gln Asp Ile Ile Ala Leu Thr Asp Trp Ser 385 390 395 400			
30	Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Met Asn 405 410 415			
35	Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Gln Pro Lys 420 425 430			
40	Glu Asn Thr Ile Trp Ala Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly val 435 440 445			
45	Asn Gly Glu Thr Ala Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Leu Pro 450 455 460			
	Phe Thr Ile Asp Lys 465			
50	<210> 13 <211> 756 <212> ADN <213> Virus de la gripe A			
55	<400> 13 atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtat gttctctcta tcgtcccgta aggccccctc aaagccgaga tagcacagag gctcgaagac gttttgcag ggaaaaaacac cgatcttgag gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggatttta		60 120 180	
60	gggttgttgc acgtcgccatc cgtgcccagt gagcggaggac tgcagcgtac acgtttgtc cagaatgcc tcaatggaa tggtgaccac aacaacatgg acaaggcgtt aaaactgtac		240 300	

	aggaaactaa aaaggaaat aacattccat gggccaagg aagtagcgct cagttactct	360
	gctggcgcac ttgccagttg catggccctc atataacaaca gaatggggac tgtcgccact	420
5	gaggtggcat ttggctggat atgcgcaacc tgtgaacaaa ttgctgattc tcagcatcga	480
	tctcatagac aaatggtac aacaaccaat ccactaatca ggcacgagaa cagaatggta	540
10	atagccagca caacagctaa gccatggaa caaatggctg gatcaagtga acaagcagca	600
	gaggctatgg aggttgccag tcaggctaga caaatggtac aggcaatgag aacaattggg	660
	actcacccta gttccagcac tggctaaaaa gatgatcttc ttgaaaattt acaggcctat	720
15	cagaaacgga tgggagtgca aatgcaacga ttcaag	756
	<210> 14	
	<211> 252	
20	<212> PRT	
	<213> Virus de la gripe A	
	<400> 14	
25	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro	
	1 5 10 15	
30	Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe	
	20 25 30	
35	Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr	
	35 40 45	
40	Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe	
	50 55 60	
45	Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val	
	65 70 75 80	
50	Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala	
	85 90 95	
55	Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala	
	100 105 110	
60	Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met	
	115 120 125	
65	Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Ala Thr Glu Val Ala Phe	
	130 135 140	
70	Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg	
	145 150 155 160	

ES 2 662 022 T3

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

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

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

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

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

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

25 <210> 15
 <211> 657
 <212> ADN
 30 <213> Virus de la gripe A

35 <400> 15
 atggactcca atactgtgtc aagctttcag gtagactgtt tcctttggca catccgcaaa 60
 cgatttgcatc acaatggatt gggtgatgcc ccattcccttgc atcggctccg ccgagatcaa
 aagtccctaa aaggaagggg caacaccctt agcctagaca tcgaaacagc cactcttgc
 40 gggaaacaaa ttgttgagtg gatttgaaa gaggaatcca gcgatatact taagatgacc 180
 attgcatttc tgcctacttc gcgttaccta gctgacatga ccctcgagga aatgtcacga
 gactggttca tgctaatgcc taggcaaaag ataataggcc ctctttgtgt gcgagtggac
 45 caggcgatca tggaaaagaa catcatactg aaagcgaact tcagtgtgat ctttaaccga
 ttagagactt tgatactact aagggctttc actgaggagg gagcaatcgt tggagaaatt
 tcaccattac cttatcttcc aggacatact aatgaggatg tcaaaaatgc agttgggtc
 50 ctcatcgag ggcttgaatg gaatggtaac acggttcgag gctctgaaaa tctacagaga
 ttcgcttggaa gaaaccataa tgaggatggg agatttcac tacctccaga acagaaa 540
 55 <210> 16
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

60 <400> 16
 Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

ES 2 662 022 T3

	His Ile Arg Lys Arg Phe Ala Asp Asn Gly Leu Gly Asp Ala Pro Phe			
5	20	25	30	
	Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Lys Gly Arg Gly Asn			
	35	40	45	
10	Thr Leu Ser Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Leu Val Gly Lys Gln Ile			
	50	55	60	
15	Val Glu Trp Ile Leu Lys Glu Glu Ser Ser Asp Ile Leu Lys Met Thr			
	65	70	75	80
20	Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Arg Tyr Leu Ala Asp Met Thr Leu Glu			
	85	90	95	
25	Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Arg Gln Lys Ile Ile			
	100	105	110	
	Gly Pro Leu Cys Val Arg Val Asp Gln Ala Ile Met Glu Lys Asn Ile			
	115	120	125	
30	Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Asn Arg Leu Glu Thr Leu			
	130	135	140	
35	Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Ile Val Gly Glu Ile			
	145	150	155	160
40	Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn			
	165	170	175	
45	Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Glu Trp Asn Gly Asn Thr Val			
	180	185	190	
	Arg Gly Ser Glu Asn Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Asn His Asn Glu			
	195	200	205	
50	Asp Gly Arg Ser Ser Leu Pro Pro Glu Gln Lys			
	210	215		
55	<210> 17			
	<211> 1695			
	<212> ADN			
	<213> Virus de la gripe A			
60	<400> 17 atgaaagtaa aactaatggc tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata	60		
	tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgtt acacagtact tgagaagaat	120		

	gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta	180
5	ctaaaaggaa tagctccact acaaattgggt agttcagcg ttgccggatg gatcttagga	240
	aaccaggagt gcgaattgct gatttccaag gaatcttgggt cctacattgt agaaacacca	300
	aatcctgaga atggaacatg ttacccaggg tatttcacag actatgaaga actgaggag	360
10	caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tccccaaaga gagctcatgg	420
	cccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcatgctccc ataacggaa aagcagcttc	480
15	tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggctgt acccaaacct gagcaagtcc	540
	tatacaaaca aaaaggagaa agaagtccctt gtactatggg gtgttcatca cccatctaac	600
	ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca	660
20	cattatagca gaagattcac cccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa	720
	ggaagaatca actactactg gaccctgcta gaaccgggg atacaataat atttgaggca	780
25	aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaactga gtaagggtt tggatcagga	840
	atcatcacat caaatgcacc aatgggtgaa tptaatgcaa agtgtcaaac acctcaggga	900
	gctataaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacacccag taacaatagg agagtcccc	960
30	aagtatgtca aaagtgc当地 attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt	1020
	caatccagag gttgtttgg agccattgcc ggtttattt aaggagggtg gactggaatg	1080
35	gtagatggtt ggtatggta tcaccatcg aatgagcaag gatctggta tgctgcagac	1140
	caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa	1200
	aaaatgaaca ctcaattcac agctgtggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg	1260
40	gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgtggg tttctagaca tttggacata taatgc当地	1320
	ttgttagttc tactggaaaa taaaaggact ttggatttcc atgactccaa cgtgaagaat	1380
45	ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcc aagaaatagg aaacgggtgt	1440
	tttgaattct atcataagtg taacgatgaa tgcattggaga gtgtgaaaaa tggacttat	1500
	gactatccaa aatattccga agaatcaaag taaaacaggg agaaaattga tggagtgaaa	1560
50	ttggaatcaa tggagtc当地 taatatcctg gcatctact caacagtgc cagttcccta	1620
	gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccaatgg gtctttacag	1680
55	tgtagaatat gc当地	1695
	<210> 18	
	<211> 565	
	<212> PRT	
60	<213> Virus de la gripe A	
	<400> 18	

ES 2 662 022 T3

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15

5 Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

10 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

15 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60

20 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Ser Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

25 Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

30 Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110

35 Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

40 Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140

45 Val Thr Gly Val Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160

50 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
 165 170 175

55 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190

60 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220

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

65 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

ES 2 662 022 T3

	Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu			
	260	265	270	
5	Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met			
	275	280	285	
10	Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser			
	290	295	300	
15	Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro			
	305	310	315	320
20	Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn			
	325	330	335	
	Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe			
	340	345	350	
25	Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His			
	355	360	365	
30	His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr			
	370	375	380	
35	Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu			
	385	390	395	400
40	Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu			
	405	410	415	
	Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu			
	420	425	430	
45	Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu			
	435	440	445	
50	Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys			
	450	455	460	
55	Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys			
	465	470	475	480
60	Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys			
	485	490	495	
	Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn			
	500	505	510	

ES 2 662 022 T3

	Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn	
5	515 520 525	
	Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val	
10	530 535 540 545 550 555 560	
15	Cys Arg Ile Cys Ile	
	565	
20	<210> 19 <211> 1407 <212> ADN <213> virus de la gripe A	
25	<400> 19 atgaatccaa atcaaaagat aataacgatt ggctctgttt ctcttactat tgccacaatg tgcttcctta tgcaaattgc catcctggta actaatgtaa cattgcactt caatcaatat	60
30	gaatgcaact accccccaaa caaccaagta atactgtgt aaccaacaat aatagaaaga aacataacag agatagtgt a tctgaccaac accaccatag agaaggaaat atgccccaaa	120
35	ctagcagaat acagaaattt gtcaaagccg caatgtaaaa ttacagggtt tgcacccccc tccaaggaca attcgattag gctttctgct ggtgggaca tttgggtgac gagagaacct	180
40	tatgtgtcat gcgatcctga taagtgttat cagttgccc ttggacaagg aacaacatta aacaacaggc attcaa atga cacagtacat gataggaccc cttatcgaac cctattgtg	240
45	aatgagttgg gtattccatt ccattttggg accaaacaag tgtgcatacg atggccagc tcaagttgtc atgatggaaa agcatggctt cacgttgta ttactggca tgatrraaat	300
50	gcaactgcta gcttcattta caatggagg cttgtagata gtattggttc atggccaaa aaaatactca ggacacagga gtcggaatgt gtttgcata atgaaactt tacagtagta	360
55	atgactgatg ggagtgcattc aggaatagct gacactaaaa tattattcat tgaagagggg aaaatcgttc atattagccy attgttagga agtgctcagc atgttagagga gtgccttgt	420
60	tatccccgat atcctggtgt cagatgcattc tgttagagaca actggaaagg ttccaataga cccgctcgtag atataaatgt aaaggattat agcattgtt ccagttatgt gtgcctcgaa	480
	cttggggag atacacccag aaaagacgac agatccagca gtagcgattg tctgaatcct aacaatgagg aaggggggca tggagtgaaa ggctggcct ttgatgtgg aatgtatgt	540
	tggatggaa gaacaatcaa cgagacgtta cgctcagggtt atgaaacctt caaagtcatt gaaggctggt ccaaacctaa ttccaaattt cagataaata ggcaagtcat agttgaaaga	600
		1020
		1080
		1140
		1200

5 ggtgataggt ccggttattc tggcatttc tctgttgaag gcaaaagctg tatcaatcg 1260
 tgctttatg tggagttgtat aagaggaagg aaacaggaaa ctgcagtatg gtggacgtca 1320
 aacagtattg ttgtgttttg tggcacctca ggtacatatg gaacaggctc atggcctgat 1380
 ggggcgaaca tcaatctcat gcctgta 1407

10 <210> 20
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (199)..(199)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (267)..(267)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 20

30 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Met Cys Phe Leu Met Gln Ile Ala Ile Leu Val Thr Asn
 20 25 30

35 Val Thr Leu His Phe Asn Gln Tyr Glu Cys Asn Tyr Pro Pro Asn Asn
 35 40 45

40 Gln Val Ile Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu
 50 55 60

45 Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys
 65 70 75 80

50 Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly
 85 90 95

55 Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly
 100 105 110

60 Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys
 115 120 125

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Arg His
 130 135 140

ES 2 662 022 T3

Ser Asn Asp Thr Val His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met
 145 150 155 160

5 Asn Glu Leu Gly Ile Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile
 165 170 175

10 Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His val
 180 185 190

15 Cys Ile Thr Gly His Asp Xaa Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn
 195 200 205

20 Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Lys Ile Leu Arg
 210 215 220

225 Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val
 230 235 240

25 Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Ile Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe
 245 250 255

30 Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Ile Ser Xaa Leu Leu Gly Ser Ala
 260 265 270

35 Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg
 275 280 285

40 Cys Ile Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Val Asp
 290 295 300

45 Ile Asn Val Lys Asp Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly
 305 310 315 320

50 Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asp Asp Arg Ser Ser Ser Ser Asp
 325 330 335

55 Cys Leu Asn Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp
 340 345 350

Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Asn Glu
 355 360 365

60 Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser
 370 375 380

Lys Pro Asn Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Glu Arg
 385 390 395 400

Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser
 405 410 415
 5

Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Gln
 420 425 430
 10

Glu Thr Ala Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly
 435 440 445
 15

Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile
 450 455 460
 20

Asn Leu Met Pro Val
 465

<210> 21
 <211> 1695
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen de HA de la gripe 10-0036-2 (n+5, en relación a parental)
 30

<400> 21
 atgaaagtaa aactaatggc tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata 60
 tgtgttaggct accatgccaa caactcaact gacactgtt acacagtact tgagaagaat
 35 gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta
 ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccggatg gatcttagga
 40 aacccagagt gcgaattgct gattccaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca
 aatcctgaga atgaaacatg ttacccaggg tatttcacag actatgaaga actgagggag
 45 caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tccccaaaga gagctcatgg
 cccaaccaca ccgttaaccgg agtgtcatca tcattgtccc ataacggaa aagcagcttc
 tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtacgt acccaaacct gagcaagtcc
 50 tatacaaaca aaaaggagaa agaagtccctt gtactatggg gtgttcatca cccatctaac
 ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca
 55 cattatagca gaagattcac cccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa
 ggaagaatca actactactg gaccctgcta gaaccgggg atacaataat atttgaggca
 aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaactga gtaagggttt tggatcagga
 60 atcatcacat caaatgcaac aatgggtgaa tgtaatgcaa cgtgtcaaac acctcaggaa
 gctataaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacacccag taacaatagg agagtgc
 960

	aagtatgtca aaagtgc当地 attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt	1020
	caatccagag gtttgttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg	1080
5	gtatgggtt ggtatggta tcaccatcg aatgagcaag gatctggta tgctgcagac	1140
	caacaagca cacaaaatgc catataatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa	1200
10	aaaatgaaca ctcaattcac agctgtggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg	1260
	gaaaacttaa ataaaaaggt tcatgtatggg tttctagaca ttggacata taatgcagaa	1320
	ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggattcc atgactccaa cgtgaagaat	1380
15	ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcc aagaaatagg aaacgggtgt	1440
	tttgaattct atcataatgt taacgatgaa tgcatggaga gtgtgaaaaa tggacttat	1500
20	gactatccaa aatattccga agaatcaaag ttacacaggg agaaaattga tggagtgaaa	1560
	ttgaaatcaa tggagtcata taatatccctg gcatctact caacagtcgc cagttcccta	1620
	gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccaatgg gtctttacag	1680
25	tgtagaatat gcattc	1695
	<210> 22	
	<211> 565	
30	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n+5, en relación a parental)	
35	<400> 22	
	Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr	
40	1 5 10 15	
	Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr	
	20 25 30	
45	Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn	
	35 40 45	
50	Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile	
	50 55 60	
55	Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly	
	65 70 75 80	
60	Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile	
	85 90 95	
	Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe	
	100 105 110	

ES 2 662 022 T3

5 Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140
 10 Val Thr Gly Val Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160
 15 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Thr Tyr Pro Asn
 165 170 175
 20 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205
 25 His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220
 30 Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu
 225 230 235 240
 35 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255
 40 Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu
 260 265 270
 Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Thr Met
 275 280 285
 45 Gly Glu Cys Asn Ala Thr Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300
 50 Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320
 55 Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335
 60 Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350
 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His

	355	360	365
5	His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr 370 375 380		
10	Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu 385 390 395 400		
15	Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu 405 410 415		
20	Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu 420 425 430		
25	Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu 435 440 445		
30	Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys 450 455 460		
35	Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys 465 470 475 480		
40	Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys 485 490 495		
45	Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn 500 505 510		
50	Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val 530 535 540		
55	Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln 545 550 555 560		
60	Cys Arg Ile Cys Ile 565		
	<210> 23 <211> 1695 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Gen de HA de la gripe 10-0036-2 (n+4, en relación a parental)		

	<400>	23					
	atgaaagtaa	aactaatggt	tctgttatgt	acatttacag	ctacatatgc	agacacaata	60
5	tgtgtaggct	accatgccaa	caactcaact	gacactgtt	acacagtact	tgagaagaat	120
	gtgacagtga	cacactctgt	caacctactt	gaggacagcc	acaatggaaa	actatgtcta	180
	ctaaaaggaa	tagctccact	acaattgggt	aattgcagcg	ttgccggatg	gatcttagga	240
10	aacccagagt	gcgaattgct	gatttccaat	gaatcttgg	cctacattgt	agaaacacca	300
	aatcctgaga	atggaacatg	ttacccaggg	tatttcacag	actatgaaga	actgagggag	360
15	caattgagtt	cagtatcttc	attnaagagg	ttcgaatata	tccccaaaga	gagctcatgg	420
	cccaaccaca	ccgtaaccgg	agtgtcatca	tcatgctccc	ataacggaa	aagcagcttc	480
	tacagaaatt	tgctatggct	gacggtgaag	aacggtacgt	acccaaacct	gagcaagtcc	540
20	tatacaaaca	aaaaggagaa	agaagtccct	gtactatggg	gtgttcatca	cccatcta	600
	ataggggacc	aaagggccct	ctatcataca	gaaaatgctt	atgtctctgt	agtgtcttca	660
25	cattatagca	gaagattcac	cccagaaata	gccaaaagac	ccaaggtgag	aaatcaggaa	720
	ggaagaatca	actactactg	gaccctgcta	gaaccgggg	atacaataat	atttgaggca	780
	aatggaaatc	taatagcacc	aaggtatgcc	ttcgaactga	gtaagggttt	tggatcagga	840
30	atcatcacat	caaatgcaac	aatgggtgaa	tgtatgcaa	agtgtcaa	acctcaggga	900
	gctataaaaca	gcagtcttcc	tttccagaat	gtacacccag	taacaatagg	agagtgc	960
35	aagtatgtca	aaagtgc	aaaatta	attaaggatg	gttacaggac	taaggaacac	1020
	caatccagag	gtt	gtttttgg	agccattg	cc	ggtttcattg	1080
	gttagatgg	tt	gtatgg	ta	cc	actggaatg	1140
40	caacaaagca	cacaaaatgc	cattaatggg	attacaaca	aggtaattc	tgtgattgaa	1200
	aaaatgaaca	ctcaattcac	agctgtggc	aaagaattca	acaaactgga	aagaagaatg	1260
45	gaaaacttaa	ataaaaaggt	tgtatgggg	tttctagaca	tttggacata	taatgcagaa	1320
	ttgttagttc	tactggaaaa	tgaaaggact	ttggatttcc	atgactccaa	cgtgaagaat	1380
	ctgtatgaga	aagtaaaaag	ccaaattaaa	aataatgcca	aagaaatagg	aaacgggtgt	1440
50	tttgaattct	atcataagt	taacgatgaa	tgc	atggaga	gtgtaaaaaa	1500
	gactatccaa	aatattccga	agaatcaaag	ttaaacaggg	agaaaattga	tggagtgaaa	1560
55	ttggaatcaa	tgggagtcta	taatatcctg	gcgatctact	caacagtgc	cagttcccta	1620
	gttcttttag	tctccctggg	ggcaatcagc	ttctggatgt	gttccaa	tgg	1680
	tgtagaatat	gc	atc				1695
60	<210>	24					
	<211>	565					
	<212>	PRT					

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> AA predicho de HA de la gripe 10-0036-2 (n+4, en relación a parental)
 <400> 24
 10 Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 15 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 20 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 25 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 30 Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 35 Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 40 Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140
 45 Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160
 50 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Thr Tyr Pro Asn
 165 170 175
 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 55 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205
 60 His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220

ES 2 662 022 T3

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

5 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

10 Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu
 260 265 270

15 Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Thr Met
 275 280 285

20 Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

25 Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320

30 Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335

35 Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

40 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365

45 His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr
 370 375 380

50 Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

55 Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

60 Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430 435 440 445

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 450 455 460 465 470 475 480

ES 2 662 022 T3

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

5 Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

10 Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn
 515 520 525

15 Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

20 Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

25 Cys Arg Ile Cys Ile
 565

30 <210> 25
 <211> 1695
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Gen de HA de la gripe 10-0036-2 (n+3, en relación a parental)

40 <400> 25
 atgaaagtaa aactaatggc tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata 60
 tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgtt acacagtact tgagaagaat 120
 gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta 180
 ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccggatg gatcttagga 240
 aaccaggagt gcgaattgct gatttccaaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca 300
 45 aatcctgaga atggAACATG ttaccccAGGG tatttcACAG actatGAAGA actgaggGAG 360
 caattgagtt cagtatCTTC atttaAGGGG ttcgAAATAT tccccAAAGA gagctcatGG 420
 50 cccAAccACA ccgtAAccGG AGTGTcatCA tcAtGCTCCC AtAACGGGAA aAGCAGCTTC 480
 tacAGAAATT tgctatGGCT gacGGTGAAG AACGGTACGT ACCCAAACCT gagcaAGTCC 540
 tatacaaaca AAAAGGAGAA AGAAGTCCTT gtactatGGG gtgttcatca cccatctaAC 600
 55 atAGGGGACC AAAGGGCCCT CTATCATAcA gAAAATGCTT ATGTCTCTGT AGTGTCTTC 660
 cattatAGCA gaAGATTcAc CCCAGAAATA GCCAAAAGAC CCAAGGTGAG AAATCAGGAA 720
 ggaAGAAATCA ACTACTACTG GACCCTGCTA GAACCCGGGG AtACAATAAT ATTGAGGCA 780
 60 aatggAAATC TAATAGCACC AAGGTATGCC TTCGAActGA GTAAGGGTT TGGATCAGGA 840
 atcatCACAT CAAATGCACC AATGGGTGAA TGTAATGCAA AGTGTCAAAC ACCTCAGGGA 900

	gctataaaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacacccag taacaatagg agagtgc 5	960
	aagtatgtca aaagtgc当地 attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt caatccagag gtttgttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg gtagatggtt ggtatggta tcaccatcag aatgagcaag gatctggta tgctgcagac 10	1020
	caacaaagca cacaaaatgc catatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa aaaatgaaca ctcaattcac agctgtggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg 15	1080
	gaaaacttaa ataaaaagggt tgatgtggg tttctagaca ttggacata taatgcagaa ttgttagttc tactggaaaa tggaggact ttggattcc atgactccaa cgtgaagaat ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcc aagaaatagg aaacgggtgt 20	1140
	tttgaattct atcataagtg taacgatgaa tgcatggaga gtgtgaaaaa tggaacttat gactatccaa aatattccga agaatcaaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaaa 25	1200
	ttggaatcaa tggagtc当地 taatatcctg gcgatctact caacagtcgc cagttcccta gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccaatgg gtctttacag tgtagaatat gcata 30	1260
	<210> 26 <211> 565 <212> PRT 35 <213> Secuencia artificial	1320
	<220> <223> AA predicho de HA de la gripe 10-0036-2 (n+3, en relación a parental) 40 <400> 26	1380
	Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr 1 5 10 15	1440
	45 Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr 20 25 30	1500
	50 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn 35 40 45	1560
	Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile 55 60	1620
	55 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly 65 70 75 80	1680
	60 Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile 85 90 95	1695

ES 2 662 022 T3

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110

5 Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

10 Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140

15 Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Thr Tyr Pro Asn
 165 170 175

20 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190

25 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205

30 His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220

35 Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu
 225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

40 Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu
 260 265 270

45 Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285

50 Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

55 Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320

Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335

60 Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

ES 2 662 022 T3

	Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
5	355 360 365
	His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr
	370 375 380
10	Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
	385 390 395 400
15	Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
	405 410 415
20	Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
	420 425 430 435
25	Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
	435 440 445
	Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
	450 455 460
30	Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
	465 470 475 480
35	Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
	485 490 495
40	Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
	500 505 510
45	Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn
	515 520 525
	Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
	530 535 540
50	Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
	545 550 555 560
55	Cys Arg Ile Cys Ile
	565
60	<210> 27 <211> 1695 <212> ADN <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223>	Gen de HA de la gripe 10-0036-2 (n+2, en relación a parental)
	<400>	27
5	atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata	60
	tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgtt acacagtact tgagaagaat	120
10	gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta	180
	ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccggatg gatcttagga	240
	aacccagagt gcgaattgct gatttccaat gaatcttggt cctacattgt agaaacacca	300
15	aatcctgaga atggaacatg ttacccaggg tatttcacag actatgaaga actgagggag	360
	caatttgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tccccaaaga gagctcatgg	420
20	cccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcatgctccc ataacggaa aagcagcttc	480
	tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggctgtt acccaaacct gagcaagtcc	540
	tatacaaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcatca cccatctaac	600
25	ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca	660
	cattatagca gaagattcac cccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa	720
30	ggaagaatca actactactg gaccctgcta gaaccgggg atacaataat atttgaggca	780
	aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaactga gtaagggttt tggatcagga	840
	atcatcacat caaatgcacc aatgggtgaa tgtaatgcaa agtgtcaaac acctcaggaa	900
35	gctataaaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacacccag taacaatagg agagtgc当地	960
	aagtatgtca aaagtgc当地 attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt	1020
40	caatccagag gtttgtttgg agccattgccc ggtttcattt aaggagggtg gactggaatg	1080
	gtagatggtt ggtatggta tcaccatcag aatgagcaag gatctggta tgctgc当地	1140
	caacaaagca cacaaaatgc catatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa	1200
45	aaaatgaaca ctcaattcac agctgtggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg	1260
	gaaaacttaa ataaaaaggat ttagatggg tttctagaca tttggacata taatgc当地	1320
	ttgttagtt tactggaaaa tggaaaggact ttggatttcc atgactccaa cgtgaagaat	1380
50	ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaaatagg aaacgggtgt	1440
	tttgaattct atcataagtg taacgatgaa tgc当地ggg gtagtggaaaa tggacttat	1500
55	gactatccaa aatattccga agaatcaaag ttaaacaggg agaaaattga tggaggtaaa	1560
	ttggaaatcaa tgggagtc当地 taatatcctg gcatctact caacagtc当地 cagttcccta	1620
	gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccatgg gtctttacag	1680
60	tgtagaatat gc当地	1695

5 <210> 28
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> AA predicho de HA de la gripe 10-0036-2 (n+2, en relación a parental)
 <400> 28
 15 Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15
 20 Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 25 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 20 35 40 45
 30 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 35 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 40 Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 45 Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110
 50 Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 55 Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140
 60 Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160
 65 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
 165 170 175
 70 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 75 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205
 80 His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg

ES 2 662 022 T3

	210	215	220
5	Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu 225 230 235 240		
10	Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile 245 250 255		
15	Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu 260 265 270		
20	Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met 275 280 285		
25	Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser 290 295 300		
30	Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro 305 310 315		
35	Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn 325 330 335		
40	Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe 340 345 350		
45	Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His 355 360 365		
50	His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr 370 375 380		
55	Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu 385 390 395 400		
60	Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu 405 410 415		
	Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu 420 425 430		
	Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu 435 440 445		
	Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys 450 455 460		

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

5 Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

10 Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

15 Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn
 515 520 525

20 Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

25 Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

30 Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 29
 <211> 1695
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Gen de HA de la gripe 10-0036-2 (n+1, en relación a parental)

<400> 29		
atgaaaagtaa aactaatggc tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata		60
tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat		120
gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta		180
ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt agttgcagcg ttgccggatg gatcttagga		240
aaccaggagt gcgaattgct gatttccaaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca		300
aatcctgaga atggaacatg ttacccaggg tatttcacag actatgaaga actgaggag		360
caattgagtt cagttatcttc atttaagagg ttgcggatat tccccaaaga gagctcatgg		420
cccaaccaca ccgttaaccgg agtgtcatca tcattgtccc ataacggaa aagcagcttc		480
tacagaaatt tgctatggct gacgggtgg aacgggttgt acccaaacct gagcaagtcc		540
tatacaaaca aaaaggagaa agaagtccct gtactatggg gtgttcatca cccatctaac		600
ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtcttgt agtgtctca		660
cattatagca gaagattcac cccagaaata gccaaaagac ccaagggtgag aaatcaggaa		720
ggaagaatca actactactg gaccctgcta gaaccgggg atacaataat atttgaggca		780

	aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaactga gtaagggttt tggatcagga	840
	atcatcacat caaatgcacc aatgggtgaa tgtaatgcaa agtgtcaaac acctcaggga	900
5	gctataaaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacacccag taacaatagg agagtgc当地 aagtatgtca aaagtcaaa attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt	960
10	caatccagag gtttgggg agccattgcc ggtttcattt aaggagggtg gactggaatg gtatgggtt ggtatgggtt tcaccatca aatgagcaag gatctgggtt tgctgc当地 caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaaca aggtgaattc tgtgattgaa	1020 1080 1140 1200
15	aaaatgaaca ctcaattcac agctgtggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg gaaaacttaa ataaaaagggt tgatgatggg tttctagaca tttggacata taatgc当地 ttttagttc tactggaaaa taaaaggact ttggatttcc atgactccaa cgtgaagaat	1260 1320 1380
20	ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaaatagg aaacgggtgt tttgaattct atcataagtg taacgatgaa tgc当地 gactatccaa aatattccga agaatcaaag taaaacaggg agaaaattga tggagtgaaa ttggaatcaa tggagactta taatatcctg gc当地 gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccatgg gtcttacag	1440 1500 1560 1620 1680
30	tgtagaatat gcatc	1695
35	<210> 30 <211> 565 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> AA predicho de HA de la gripe 10-0036-2 (n+1, en relación a parental) <400> 30	
45	Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr 1 5 10 15	
50	Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr 20 25 30	
55	Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn 35 40 45	
60	Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile 50 55 60	
65	Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly 70 75 80	

ES 2 662 022 T3

	Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
	85 90 95
5	Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
	100 105 110
10	Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
	115 120 125
15	Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
	130 135 140
20	Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
	145 150 155 160
25	Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
	165 170 175
30	Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
	180 185 190
35	Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
	195 200 205
40	His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
	210 215 220
45	Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu
	225 230 235 240
50	Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
	245 250 255
55	Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu
	260 265 270
60	Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met
	275 280 285
	Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
	290 295 300
	Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
	305 310 315 320
65	Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
	325 330 335

Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

5 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365

10 His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr
 370 375 380

15 Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

20 Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

25 Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430

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

35 Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

40 Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

45 Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

50 Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

55 Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn
 515 520 525

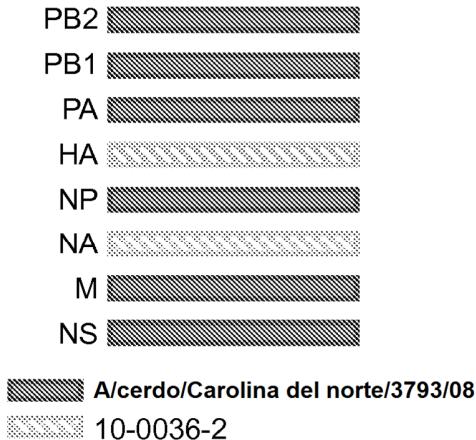
60 Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
 565

REIVINDICACIONES

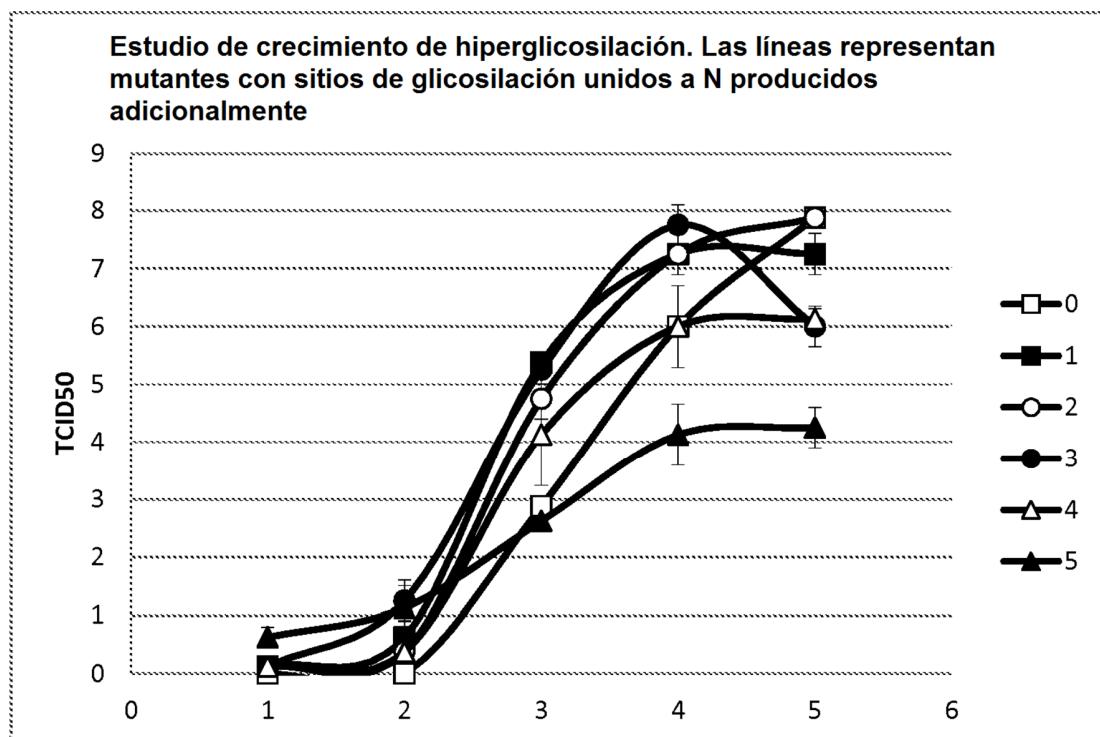
- 5 1. Cepa atenuada de la gripe porcina capaz de proporcionar una respuesta inmunitaria segura y eficaz en animales porcinos contra la gripe o enfermedades causadas por la gripe, que codifica un gen de HA que tiene al menos 4 sitios de glicosilación adicionales en relación a una cepa parental virulenta, en la que los sitios de glicosilación se seleccionan de S71N, K90N, L173T, P287T y K294T, y en la que la localización del cambio o cambios de aminoácidos se basa en el gen de HA codificada por la cepa parental virulenta que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 18.
- 10 2. Cepa, según la reivindicación 1, en la que la proteína HA tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 22.
- 10 3. Cepa, según la reivindicación 1, en la que la proteína HA tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 24.
- 10 4. Composición inmunológica que comprende la cepa atenuada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Composición, según la reivindicación 4, que comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable, y que proporciona una respuesta inmunitaria protectora en animales porcinos contra la estimulación por la gripe porcina virulenta.
- 20 6. Composición, según la reivindicación 5, que comprende además al menos un antígeno adicional asociado con o derivado de un patógeno porcino distinto de la gripe porcina; y en la que dicho al menos uno o más antígenos adicionales son capaces de provocar en un animal porcino una respuesta inmunitaria contra *M. hyo*, circovirus porcino 2 (PCV2), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la gripe porcina (SIV) u otros patógenos capaces de infectar y causar enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad en un animal porcino.
- 25 7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para usar en la vacunación de un animal porcino en la que el animal porcino es preferiblemente una cerda de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 6 semanas antes de parir.
- 30 8. Composición que comprende una pluralidad de vectores para la producción de gripe porcina atenuada que incluye un vector que comprende un promotor unido operativamente a un ADNc de HA del virus de la gripe, en la que el ADNc de HA codifica sitios de glicosilación adicionales en relación a una HA codificada por una cepa de la gripe porcina parental virulenta, en la que los sitios de glicosilación adicionales se seleccionan de S71N, K90N, L173T, P287T y K294T, y en la que la numeración de los cambios de aminoácidos se basa en el gen de la HA codificada por la cepa parental virulenta que tiene la secuencia, tal como se expone en la SEQ ID NO: 18; y preferiblemente en la que el ADNc de HA para la producción de la gripe atenuada codifica la proteína, tal como se expone en las SEQ ID NO: 22 o 24.
- 35

**Figura 1**

Seq 18 = HA (parental); Seq 22 = HA (n+5 mutante)

SEQ 18	MKVKLMVLLCTFTATYADTICVGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDHNGKLCL	60
SEQ 22	MKVKLMVLLCTFTATYADTICVGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDHNGKLCL	60
SEQ 18	LKGIAPIQLG S CSVAGWILGNPECELLIS K ESWSYIVETPNPENGTCYPGYFTDYELRE	120
SEQ 22	LKGIAPIQLG N CSVAGWILGNPECELLIS N ESWSYIVETPNPENGTCYPGYFTDYELRE	120
SEQ 18	QLSSVSSFKRFEIFPKESSWPNHTVTGVSSSCSHNGKSSFYRNLLWLTVKNG E YPNLSKS	180
SEQ 22	QLSSVSSFKRFEIFPKESSWPNHTVTGVSSSCSHNGKSSFYRNLLWLTVKNG T YPNLSKS	180
SEQ 18	YTNKKEKEVLVLWGVHHPSNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRNQE	240
SEQ 22	YTNKKEKEVLVLWGVHHPSNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRNQE	240
SEQ 18	GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFELSKGFGSGIITSNA P MGECKNA K CQTPOQG	300
SEQ 22	GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFELSKGFGSGIITSNA T MGECKNA T CQTPOQG	300
SEQ 18	AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVKSAKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM	360
SEQ 22	AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVKSAKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM	360
SEQ 18	VDGWYGYHHQNEQGSGYAADQOSTQNAINGITNKVNNSIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM	420
SEQ 22	VDGWYGYHHQNEQGSGYAADQOSTQNAINGITNKVNNSIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM	420
SEQ 18	ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVSQLKNNAKEIGNGC	480
SEQ 22	ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVSQLKNNAKEIGNGC	480
SEQ 18	FEFYHKCNDECMEVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMSGVYNILAIYSTVASSL	540
SEQ 22	FEFYHKCNDECMEVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMSGVYNILAIYSTVASSL	540
SEQ 18	VLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI	565
SEQ 22	VLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI	565

Figura 2



	Virus rescatado	sitios de glicosilación adicionales(n)
0	Rg parental (10-0036-2)	0
1	S71N	1
2	S71N, K90N	2
3	S71N, K90N, L173T	3
4	S71N, K90N, L173T, P287T	4
5	S71N, K90N, L173T, P287T, K294T	5

Figura 3

SEQ ID NO.	TIPO	DESCRIPCIÓN
1	ADN	gen de PB2 de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
2	PRT	AA predicho de PB2 de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
3	ADN	gen de PB1 de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
4	PRT	AA predicho de PB1 de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
5	ADN	gen de PA de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
6	PRT	AA predicho de PA de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
7	ADN	gen de HA de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
8	PRT	AA predicho de HA de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
9	ADN	gen de NP de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
10	PRT	AA predicho de NP de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
11	ADN	gen de NA de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
12	PRT	AA predicho de NA de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
13	ADN	gen de M de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
14	PRT	AA predicho de M de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
15	ADN	gen de NS de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
16	PRT	AA predicho de NS de gripe A/cerdo/Carolina del norte/3793/08(H1N1) – 10-0036-2
17	ADN	gen de HA de gripe 10-0036-2 (n + 0, parental) - RG 10-0036-2
18	PRT	AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n + 0, parental) - RG 10-0036-2
19	ADN	gen de NA de gripe 10-0036-2 (n + 0, parental) - RG 10-0036-2
20	PRT	AA predicho de NA de gripe 10-0036-2 (n + 0, = parental) - RG 10-0036-2
21	ADN	gen de HA de gripe 10-0036-2 (n + 5, en relación a RG 10-0036-2)
22	PRT	AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n + 5, en relación a RG 10-0036-2)
23	ADN	gen de HA de gripe 10-0036-2 (n + 4, en relación a RG 10-0036-2)
24	PRT	AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n + 4, en relación a RG 10-0036-2)
25	ADN	gen de HA de gripe 10-0036-2 (n + 3, en relación a RG 10-0036-2)
26	PRT	AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n + 3, en relación a RG 10-0036-2)
27	ADN	gen de HA de gripe 10-0036-2 (n + 2, en relación a RG 10-0036-2)
28	PRT	AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n + 2, en relación a RG 10-0036-2)
29	ADN	gen de HA de gripe 10-0036-2 (n + 1, en relación a RG 10-0036-2)
30	PRT	AA predicho de HA de gripe 10-0036-2 (n + 1, en relación a RG 10-0036-2)

Figura 4