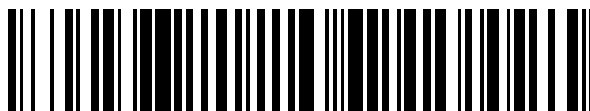


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 623**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2011** **PCT/US2011/022775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011** **WO11094445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2011** **E 11737670 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 2528615**

54 Título: **Agentes polipeptídicos técnicamente diseñados para la neutralización dirigida de amplio espectro de la gripe**

30 Prioridad:

27.01.2010 US 298776 P

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

20.01.2021

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)**

**77 Massachusetts Av
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SASISEKHARAN, RAM;
VISWANATHAN, KARTHIK;
SOUNDARARAJAN, VENKATARAMANAN;
RAGURAM, SASI;
SASISEKHARAN, VISWANATHAN y
SUBRAMANIAN, VIDYA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 802 623 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

Agentes polipeptídicos técnicamente diseñados para la neutralización dirigida de amplio espectro de la gripe

5 Antecedentes de la invención

El virus de la gripe es una amenaza para la salud mundial que es responsable de más de 300.000 muertes al año. El virus evade el reconocimiento inmunitario al participar en una combinación de variaciones antigénicas menores, reagrupamiento de dominios, recombinación genética y enmascaramiento basado en glucosilación de sus glucoproteínas de superficie acelerados. Esta capacidad de mutación rápida del virus se ve especialmente exacerbada en el contexto de la creciente amenaza de la actual pandemia de la 'gripe porcina' H1N1, así como la alarmante alarma mundial con infecciones recientes con cepas de 'gripe aviar' H5N1 aviar altamente patógenas. (Khanna *et al.*, Journal of Biosciences, 33(4):475, 2008, Soundararajan *et al.*, Nature Biotechnology 27:510, 2009). Adicionalmente, dos de las principales pandemias de gripe del siglo pasado se originaron a partir de virus de gripe aviar que cambiaron su composición genética para permitir la infección en humanos.

Dado el alto grado de imprevisibilidad en la evolución de estos virus de la gripe, existe la necesidad de desarrollar opciones preventivas terapéuticas antigripales con efecto cruzado (universal o de amplio espectro) eficaz entre distintas cepas. Dichos agentes antigripales universales o de amplio espectro aumentarían las vacunas contra la gripe estacional que están diseñadas para tener como objetivo cepas víricas 'estacionales' específicas en circulación. (Ekiert *et al.*, Science, 324(5924):246, 2009 y Sui *et al.*, Nat Struct Mol Biol. 16(3):265, 2009; Throsby *et al.*, Plos One, 3; 5942, 2008). El documento WO01/55315 describe proteínas y sus usos en medicina. El documento US2010/0004195 describe señuelos de glucanos con topología de paraguas para su uso en métodos para el tratamiento de la gripe. La importancia de tales agentes se pone de relieve por la resistencia a fármacos emergente para los antiviricos Tamiflu/Relenza (inhibidores de NA) y Amantadina/Rimantadina (inhibidores de MP-2) (Collins *et al.*, Nature 453:1258, Stouffer *et al.*, Nature, 451:596, 2008, Pielak *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106:7379, 2009). Por ejemplo, más del 98 % y el 100 % de las cepas H1N1 son resistentes esta temporada al Tamiflu y a los derivados de adamantano (Amantadina/Rimantadina), respectivamente. Adicionalmente, las vacunas contra la gripe estacional se desarrollan basándose en predicciones de la cepa de gripe más virulenta. En algunos casos, estas predicciones son incorrectas, haciendo de este modo que las vacunas contra la gripe estacional sean menos eficaces. Por estas razones, existe la necesidad de desarrollar vacunas de amplio espectro y agentes terapéuticos que sean eficaces en el tratamiento o el retraso del inicio de la enfermedad provocada por los virus de la gripe, independientemente del subtipo o clado. Obviamente, también hay un valor significativo en los agentes que sean eficaces contra cualquier cepa gripales y, de hecho, puede haber un valor profundo en los agentes que son específicos para una o para un conjunto de cepas.

35 Sumario de la invención

La protección buscada para la presente invención es como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona agentes para la inhibición de la infección gripal. La presente invención proporciona agentes que se unen a un virus de la gripe (por ejemplo, al polipéptido HA del virus) y/o que se unen al receptor de la HA. La presente invención proporciona agentes de amplio espectro para la neutralización de la gripe.

En particular, la presente invención proporciona agentes polipeptídicos, denominados "agentes de plegamiento interno" ("*inifold agents*", que se unen a regiones particulares en un polipéptido hemaglutinina (HA). Por ejemplo, la presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que se unen a la región epitópica proximal de membrana (MPER, forma siglada de *membrane proximal epitope region*) del polipéptido HA. Los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER independientemente de la glucosilación de la HA. Los agentes de plegamiento interno interactúan con uno o más restos de aminoácido en el polipéptido HA y/o con uno o más glucanos unidos al polipéptido HA. Los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos unidos en N en el polipéptido HA. Los agentes de plegamiento interno se unen a N-glucanos proximales a la MPER en el polipéptido HA.

Los agentes de plegamiento interno se unen a receptores de HA. Los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos sialilados en los receptores de HA. Los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos sialilados que tienen topología de sombrilla. Los agentes de plegamiento interno se unen con alta afinidad y/o especificidad a glucanos con topología de paraguas (por ejemplo, en comparación con la unión a glucanos de otras topologías, tales como los glucanos con topología de cono).

Los agentes de plegamiento interno compiten con la hemaglutinina para unirse a un receptor de HA. Los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a un glucano con topología de paraguas.

Los agentes de plegamiento interno se caracterizan por una estructura de cadena principal plegada seleccionada y dimensionada para encajar dentro de un espacio tridimensional predeterminado (por ejemplo, un bolsillo de unión) y para presentar "restos de interacción" seleccionados de modo que se posicionen en un espacio tridimensional dentro de una distancia designada de "restos diana" identificados en el polipéptido HA y/o el receptor de HA. Un agente de plegamiento interno se caracteriza por una primera estructura de cadena principal plegada seleccionada y dimensionada para encajar dentro de un sitio de unión del polipéptido HA, y una segunda estructura de cadena

principal plegada seleccionada y dimensionada para encajar dentro de un sitio de unión al receptor de HA.

La presente divulgación proporciona diversos reactivos y métodos asociados con agentes de plegamiento interno que incluyen, por ejemplo, sistemas para identificarlos, estrategias para prepararlos, anticuerpos que se unen a ellos y diversos métodos de diagnóstico y terapéuticos relacionados con ellos. A continuación, se presenta una descripción adicional de determinadas realizaciones de estos aspectos, y otros, de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Presenta enfoques para lograr una neutralización dirigida y de espectro completo (amplio) de la gripe utilizando una molécula dirigida de amplio espectro (agente de plegamiento interno), (a) Agentes de plegamiento interno que se unen a la MPER de la HA (círculo rojo) y a receptores de HA (por ejemplo, a glucanos sialilados en los receptores de HA) (círculo verde); (b) Agente de plegamiento interno que se une a la MPER de la HA (círculo rojo), a un N-glucano proximal a MPER (círculo negro) y a glucanos sialilados en los receptores de HA (círculo verde); (c) Agente de plegamiento interno que se une a la MPER de la HA (círculo rojo); (d) Agente de plegamiento interno que se une a la MPER de la HA (círculo rojo) y a un N-glucano proximal a MPER (círculo negro).

Figura 2. Conservación de la región epitópica proximal de membrana (MPER) para las cepas del virus de la gripe del grupo 1 y del grupo 2 (Stouffer *et al.*, Nature, 451:596, 2008). Se muestran los principales restos de la MPER en HA-1 (dominio de la cabeza globular) y HA-2 (dominio de tallo) y los aminoácidos prominentes de cada cepa en estas posiciones se colorean de acuerdo con el grado de conservación del clado cruzado (naranja = más conservado posiciones).

Figura 3. Fundamento estructural de las limitaciones de los anticuerpos para el direccionamiento a la MPER de la HA del virus de la gripe N-glucosilado. El anticuerpo F10 (rosa) acoplado a HA H3 (beis/gris) N-glucosilada en Asn-38 (carbono verde) muestra que las cadenas beta C' y C" adicionales (negro) que constituyen dos de las nueve cadenas beta en todos los dominios VH de los anticuerpos, son responsables principalmente del impedimento estérico de la unión de los anticuerpos.

Figura 4. Fundamento estructural para la reducción del área de MPER disponible para el direccionamiento en la HA glucosilada. En los polipéptidos HA no glucosilados (parte superior), está disponible para el direccionamiento un área de MPER de $28 \times 11,5 \sim 325 \text{ \AA}^2$, mientras que solo está disponible para la unión en los polipéptidos HA N-glucosilados (parte inferior) una reducida área de MPER de $0,5 \times (12,3 \times 15,3 + 9,5 \times 12,2) \sim 152 \text{ \AA}^2$.

Figura 5. Ilustra distintos conjuntos de posibles restos diana en un polipéptido HA y, específicamente, en y/o alrededor de la región MPER del polipéptido HA. El polipéptido HA particular representado es un polipéptido HA H3 de la entrada 1HGG de la ID del Protein Data Bank (ID de PDB).

Figura 6. (Parte superior) Unión del Plegamiento interno 3 (*Infold-3*) a la MPER de la HA no glucosilada. (Parte inferior) El Plegamiento interno 3 (rojo) se une a la MPER de la HA N-glucosilada (gris/beis). adaptándose al N-glucano (carbono verde) debido a su menor volumen y la falta de las dos cadenas adicionales con respecto a las de los anticuerpos, como se muestra en la Figura 3.

Figura 7. Presenta la unión de un agente de plegamiento interno ejemplar en comparación con la unión del anticuerpo C179 a polipéptidos HA seleccionados, por ejemplo, H1, H3, H5, H7 y H9.

Figura 8. Presenta un receptor de HA con glucano $\alpha 2,6$ -sialilado (topología paraguas) (verde azulado), en este caso se muestra unido al polipéptido HA del H1N1 (gris) de la gripe de origen porcino del 2009 (comúnmente conocida como "gripe pandémica").

Figura 9. Presenta un ejemplo de un motivo de reconocimiento de glucano sialilado en $\alpha 2,6$, utilizado en el diseño de la unión del Plegamiento interno 9 y el Plegamiento interno 10 a los receptores de HA con glucano sialilado en $\alpha 2,6$ para la administración terapéutica dirigido contra la gripe.

Figura 10. Presenta un esbozo para comprender la especificidad del receptor con glucano. Los glucanos unidos en $\alpha 2,3$ y/o $\alpha 2,6$ pueden adoptar distintas topologías. Se cree que la capacidad de un polipéptido HA para unirse a determinadas topologías le confiere la capacidad de actuar como mediador en la infección de distintos hospedadores, por ejemplo en seres humanos. La presente divulgación se refiere a dos topologías de particular importancia, una topología de "cono" (panel izquierdo) y una topología de "paraguas" (panel derecho). La topología de cono puede ser adoptada por glucanos unidos en $\alpha 2,3$ y/o $\alpha 2,6$, y es típica de oligosacáridos cortos u oligosacáridos ramificados unidos a un núcleo (aunque esta topología puede ser adoptada por determinados oligosacáridos largos). La topología de paraguas solo puede ser adoptada por los glucanos unidos a $\alpha 2,6$ (presumiblemente debido a la mayor pluralidad conformacional proporcionada por el enlace C5-C6 adicional que está presente en el enlace $\alpha 2,6$), y es predominantemente adoptada por oligosacáridos largos o glucanos ramificados con ramas de oligosacáridos largas, que contiene particularmente el motivo Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal $\beta 1-3/4$ GlcNAc.

Figura 11. Ilustra topologías de cono ejemplares. Esta Figura ilustra determinadas estructuras de glucanos ejemplares (pero no exhaustivas) que adoptan topologías de cono.

Figura 12. Ilustra topologías de paraguas ejemplares. (A) Determinadas estructuras de glucano unido en N y en O ejemplares (pero no exhaustivas) que pueden adoptar topologías de *paraguas*. (B) Determinadas estructuras de glucano unido en O ejemplares (pero no exhaustivas) que pueden adoptar topologías de paraguas.

Figura 13. Ilustra posibles conjuntos de restos de interacción y/o de unión del agente de plegamiento interno, seleccionados y diseñados para interactuar y/o unirse con los restos diana indicados en un polipéptido HA. Como se muestra, el polipéptido HA es un polipéptido HA H1.

Figura 14. Presenta imágenes de la estructura del ID de PDB 2V5Y (número de identificación del protein data bank) en los modelos representativos de cintas y de barras.

Figura 15. Ilustra que un agente de plegamiento interno ejemplar inhibe la infectividad del virus de la gripe PR8 (H1N1) *in vitro*. El panel izquierdo destaca que el agente de plegamiento interno ejemplar inhibe la producción de placas inducida por virus de una manera dependiente de la dosis para 6 dosis distintas.

Figura 16. Compara la actividad de un agente de plegamiento interno ejemplar con la de un control (BSA) y la del anticuerpo C179, utilizando un ensayo de placas con 4 dosis. Como se muestra en el ensayo de placas, el agente de plegamiento interno ejemplar inhibe la infectividad del virus de la gripe.

Figura 17. Presenta una exposición a H1N1 en ratones. En esta exposición, un agente de plegamiento interno ejemplar demuestra el inicio retardado de H1N1 en ratones, en comparación con el control de PBS. El agente de plegamiento interno ejemplar muestra un retraso del inicio similar al del fármaco antivírico, la Ribavirina, comenzando alrededor del día cinco.

Figura 18. Presenta ratones tratados con un agente de plegamiento interno ejemplar en una exposición a H1N1. En esta exposición, los ratones tratados con el agente de plegamiento interno ejemplar tienen el menor porcentaje de pérdida de peso posinfección en comparación con el control de PBS o el fármaco antivírico, la Ribavirina.

Figura 19. Presenta las relaciones filogenéticas entre subtipos de HA, mostrando las divisiones de los subtipos del virus de la gripe en grupos, clados y clústeres.

Figura 20. Presenta una evaluación ejemplar de la actividad neutralizante de un agente de plegamiento interno particular (Plegamiento interno 28) descrito en el presente documento, utilizando cristal violeta.

Figura 21. Presenta una evaluación ejemplar de la actividad del agente de Plegamiento interno 28 en MDCK utilizando RT-PCR para cuantificar directamente las cantidades de genoma vírico. Los resultados muestran que el agente de plegamiento interno analizado (Plegamiento interno 28) es un inhibidor potente; la CI_{50} está afectada por la multiplicidad de infección (moi).

Figura 22. Presenta los efectos de la preincubación del agente de Plegamiento interno 28 con PR8 sobre la infectividad en células MDCK. Después de la infección, las células MDCK se cultivaron en medio sin virus con (a) o sin (b) agente de Plegamiento interno 28 durante 48 horas antes de cuantificar el título vírico mediante PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para la proteína M del virus. = valor de CI_{50} calculado.

Definiciones

Afinidad: Como se conoce en la técnica, la "afinidad" es una medida del ajuste ceñido con que un ligando particular (por ejemplo, un polipéptido HA o agente de plegamiento interno) se une a su compañero (por ejemplo, y un receptor de HA). Las afinidades se pueden medir de distintas maneras.

Aminoácido: Como se usa en el presente documento, "aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido natural o no natural (véanse las definiciones de "aminoácido natural" y "aminoácido no natural" a continuación).

Anticuerpo: Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende incluir inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivas con la proteína o péptido designado, o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos adecuados incluyen, pero sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos conjugados (es decir, anticuerpos conjugados o fusionados a otras proteínas, radiomarcadores, citotoxinas), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños ("SMIPs™", forma siglada de *Small Modular ImmunoPharmaceuticals*), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos cameloides y fragmentos de anticuerpos. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" también incluye anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos

de los mismos)), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos para su uso en el presente documento pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).

Un anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo. Se apreciará que un fragmento de anticuerpo puede incluir una parte de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región de unión a antígeno o variable de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; triacuerpos; tetracuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo puede también incluir cualquier proteína sintética o modificada por ingeniería genética, que actúa como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden incluir fragmentos aislados, fragmentos "Fv", que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en las cuales las regiones variables de las cadenas ligera y pesada están conectadas por un enlazador peptídico ("proteínas ScFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable.

Plegamiento en sándwich β : Un "plegamiento en sándwich β " es un dominio polipeptídico que tiene entre 5-12 cadenas β cuando su estructura se determina de forma experimental o se predice informáticamente mediante cualquier método, con una RECM (raíz del error cuadrático medio) de C α menor o igual a 6 angstroms tras la superposición sobre los restos 260-355 (cadena A) de la estructura con el IDDE PBD 2V5Y (véase la Figura 14). Además, dicha RECM tras la superposición de regiones estructurales secundarias (excluyendo los bucles) puede ser menor o igual a 5 Å. Los dominios de plegamiento interno constituyen los dominios de "reconocimiento de la diana" de los agentes de plegamiento interno.

Unión: Se entenderá que el término "unión", como se usa en el presente documento, normalmente se refiere a una asociación no covalente entre o de agentes. La unión se puede abordar con respecto a polipéptidos HA particulares, glucanos particulares (por ejemplo, glucanos unidos en N, glucanos con topología de paraguas o glucanos con topología de cono) o receptores de HA particulares. Los expertos en la materia apreciarán que tal unión puede evaluarse en cualquiera de una diversidad de contextos. La unión puede evaluarse con respecto al polipéptido HA. La unión puede evaluarse con respecto a glucanos unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a un vehículo. El vehículo puede ser un polipéptido. La unión puede evaluarse con respecto a glucanos unidos a un receptor de HA. Se puede hacer referencia a la unión del receptor o a la unión del glucano.

Sitio de unión: La expresión "sitio de unión", como se usa en el presente documento, se refiere a una región de un polipéptido diana, formado en un espacio tridimensional, que incluye los restos de interacción del polipéptido diana. Como entenderán los expertos en la materia, un sitio de unión puede incluir restos que son adyacentes entre sí en una cadena lineal, y/o están distales entre sí en una cadena lineal pero cerca uno del otro en un espacio tridimensional cuando el polipéptido diana está plegado. Un sitio de unión puede comprender restos de aminoácido y/o restos de azúcar.

Biológicamente activo: Como se usa en el presente documento, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico y en particular en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activo. Cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una parte de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina normalmente parte "biológicamente activa".

Amplio espectro: Como se usa en el presente documento, la frase "amplio espectro" se refiere a agentes de plegamiento interno que se unen a una diversidad de polipéptidos HA de distintas cepas del virus de la gripe. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno de amplio espectro se unen a una pluralidad de polipéptidos HA distintos. Los ejemplos de tales polipéptidos HA incluyen, los polipéptidos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16, o combinaciones de los mismos. Los agentes de plegamiento interno proporcionados de la invención son de amplio espectro en el sentido de que se unen a polipéptidos HA de al menos dos clados o clústeres de virus distintos. Los agentes de plegamiento interno proporcionados de la invención son de amplio espectro en el sentido de que se unen a polipéptidos HA de todos los clados de virus conocidos. Los agentes de plegamiento interno proporcionados de la invención son de amplio espectro en el sentido de que se unen a polipéptidos HA de los virus de la gripe del grupo 1 y del grupo 2. Amplio espectro se refiere a polipéptidos HA que actúan como mediadores en la infección de hospedadores particulares, por ejemplo, de un ave, camello, cánido, gato, civeta, equino, ser humano, leopardo, visón, ratón, foca, garduña, cerdo, tigre, ballena, etc.

Sustrato candidato: Como se usa en el presente documento, la frase "sustrato candidato" se refiere a los sustratos de uno o más agentes de plegamiento interno. Los sustratos candidatos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos y azúcares. Los sustratos candidatos incluyen regiones de polipéptidos HA, la región MPER de polipéptidos HA, N-glucanos en polipéptidos HA, receptores de HA, receptores de HA sialilados, glucanos en receptores de HA sialilados y/o glucanos con topología de paraguas en receptores de HA sialilados.

Parte característica: Como se usa en el presente documento, la frase una "parte característica" de una proteína o polipéptido es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que juntos son característicos de una proteína o polipéptido. Cada uno de tales tramos continuos generalmente contendrá al menos dos aminoácidos. Adicionalmente, los expertos en la materia apreciarán que normalmente se precisan al menos 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos para ser característicos de una proteína. En general, una parte característica es una que, además de la identidad de secuencia especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la proteína intacta de interés.

Secuencia característica: Una "secuencia característica" es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos y, por lo tanto, los expertos en la materia pueden utilizarla para definir miembros de la familia.

Terapia de combinación: La expresión "terapia de combinación", como se usa en el presente documento, se refiere a las situaciones en las que se administran dos o más agentes distintos en regímenes superpuestos para que el sujeto esté expuesto a ambos agentes de forma simultánea.

Topología de cono: La frase "topología de cono" se usa en el presente documento para referirse a una disposición tridimensional adoptada por determinados glucanos y, en particular, por glucanos en receptores de HA. Como se ilustra en la Figura 10, la topología de cono la pueden adoptar los glucanos sialilados en α 2,3 o los glucanos sialilados en α 2,6, y es típica de cadenas oligonucleotídicas cortas, aunque algunos oligonucleótidos largos también pueden adoptar esta conformación. La topología de cono se caracteriza por los ángulos de torsión glucosídicos del enlace Neu5Ac α 2,3 Gal que muestrea tres regiones de conformaciones de energía mínima proporcionadas por un valor ϕ (C1-C2-O-C3/C6) de alrededor de -60, 60 o 180 y ψ (C2-O-C3/C6-H3/C5) muestrea de -60 a 60. La Figura 11 presenta determinados ejemplos representativos (aunque no exhaustivos) de glucanos que adoptan una topología de cono.

Aminoácidos de unión directa: Como se usa en el presente documento, la frase "aminoácidos de unión directa" se refiere a restos de aminoácido que interactúan directamente con un compañero de unión (por ejemplo, uno o más aminoácidos, glucanos, etc.). Normalmente, los restos de interacción son aminoácidos de unión directa.

Técnicamente diseñado: El término "técnicamente diseñado", como se usa en el presente documento, describe un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos ha sido seleccionada por el hombre. Por ejemplo, un agente de plegamiento interno técnicamente diseñado tiene una secuencia de aminoácidos que se seleccionó basándose en preferencias para los aminoácidos correspondientes en sitios particulares de las interacciones proteína-proteína. Una secuencia de plegamiento interno técnicamente diseñada tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos HA incluidos en la base de datos del NCBI.

Polipéptido hemaglutinina (HA): Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de hemaglutinina" (o "polipéptido HA") se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una secuencia característica de HA. En la técnica se conoce una amplia diversidad de secuencias de HA de aislados gripales; de hecho, el National Center for Biotechnology Information (NCBI) mantiene una base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) que, a partir de la presentación de la presente solicitud incluyó 9796 secuencias de HA. Los expertos en la materia, haciendo referencia a esta base de datos, pueden identificar fácilmente secuencias que son características de los polipéptidos HA en general, y/o de polipéptidos HA particulares (por ejemplo, los polipéptidos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16; o de polipéptidos HA que actúan como mediadores en la infección de hospedadores particulares, por ejemplo, de un ave, camello, cánido, gato, civeta, del medio ambiente, equino, ser humano, leopardo, visón, ratón, foca, garduña, cerdo, tigre, ballena, etc. Por ejemplo, un polipéptido HA puede incluir uno o más elementos de secuencia característicos que se encuentran entre aproximadamente los restos 97 y 185, 324 y 340, 96 y 100, y/o 130-230 de una proteína HA encontrada en un aislado natural de un virus de la gripe. El polipéptido HA puede estar compuesto por los dominios HA-1 (tallo) y HA-2 (cabeza) de la HA. El polipéptido HA puede incluir el elemento de secuencia característico de la región epitópica proximal de membrana (MPER) de la HA. Una región del polipéptido HA puede estar glucosilada. Una región del polipéptido HA puede no estar glucosilada.

En combinación: La frase "en combinación", como se usa en el presente documento, se refiere a agentes que se administran de forma simultánea a un sujeto. Se apreciará que se considera que dos o más agentes se administran "en combinación" cuando un sujeto se expone simultáneamente a ambos (o más) agentes. Cada uno de los dos o más agentes puede administrarse de acuerdo con un programa distinto; no es necesario administrar dosis individuales de los distintos agentes al mismo tiempo o en la misma composición. Más bien, siempre que ambos (o más) agentes permanezcan en el cuerpo del sujeto, se consideran que se administran "en combinación".

Agente de plegamiento interno: En general, la expresión "agente de plegamiento interno" se usa en el presente documento para referirse a un agente que se une a un sitio de unión seleccionado, agente que comprende un polipéptido. Un agente de plegamiento interno puede tener una estructura caracterizada por una cadena principal "plegada" poblada por restos de interacción seleccionados y dispuestos de manera que, cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión, los restos de interacción individuales se colocan dentro de una distancia o volumen preseleccionado de restos diana afines. Un polipéptido de agente de plegamiento interno puede

ser un polipéptido diseñado o técnicamente diseñado. Los agentes de plegamiento interno proporcionados en el presente documento se unen a un polipéptido hemaglutinina (HA). En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a un polipéptido HA en su región MPER. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a una región MPER de un polipéptido HA independientemente de su glucosilación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno están diseñados para tener el tamaño apropiado para que su unión a una región MPER no esté impedida por su glucosilación. Un agente de plegamiento interno puede unirse a una región MPER glucosilada con una afinidad de al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más de su afinidad por una región MPER no glucosilada, por lo demás idéntica. Los agentes de plegamiento interno pueden tener tamaños volumétricos entre 6000-120.000 Å³. Los agentes de plegamiento interno proporcionados pueden tener un tamaño volumétrico que sea igual o menor que el tamaño volumétrico de un anticuerpo. Un agente de plegamiento interno puede tener un área de superficie de epítipo diana total de aproximadamente 20 x 30 = 600 Å². El área de superficie de epítipo diana total de un agente de plegamiento interno puede ser inferior a aproximadamente 10 Å², 20 Å², 30 Å², 40 Å², 50 Å², 60 Å², 70 Å², 80 Å², 85 Å², 90 Å², 95 Å², 100 Å², 105 Å², 110 Å², 115 Å², 120 Å², 125 Å², 130 Å², 135 Å², 140 Å², 145 Å², 150 Å², 151 Å², 152 Å², 153 Å², 154 Å², 155 Å², 160 Å², 165 Å², 170 Å², 175 Å², 180 Å², 185 Å², 190 Å², 195 Å², 200 Å², 210 Å², 220 Å², 230 Å², 240 Å², 250 Å², 260 Å², 270 Å², 280 Å², 290 Å², 300 Å², 310 Å², 315 Å², 320 Å², 325 Å², 330 Å² o mayor. El área de superficie de epítipo diana total puede ser inferior a aproximadamente 200 Å², aproximadamente 175 Å², aproximadamente 150 Å², aproximadamente 125 Å² o más pequeña. Los agentes de plegamiento interno como se reivindican tienen una longitud que es inferior a aproximadamente 1000 aminoácidos. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno tienen una longitud que es menor que una longitud máxima de aproximadamente 1000, 975, 950, 925, 900, 875, 850, 825, 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno tienen una longitud que es mayor que una longitud mínima de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno tienen una longitud entre una cualquiera de tales longitudes mínimas y una cualquiera de tales longitudes máximas, siempre que la longitud máxima sea mayor que la longitud mínima. En algunas realizaciones particulares, un agente de plegamiento interno tiene una longitud de entre aproximadamente 20 y 500, o de entre 30 y 400, o de entre 40 y 300, o de entre 80 y 250 aminoácidos. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno tiene una longitud de aproximadamente 84, 88, 93, 95, 98, 104, 106, 110, 111, 116, 119, 123, 124, 132, 212, 215, 244 o 245. Los agentes de plegamiento interno pueden estar compuestos por aminoácidos naturales. Los agentes de plegamiento interno pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. Los agentes de plegamiento interno pueden estar compuestos por combinaciones de aminoácidos naturales y no naturales. Un agente de plegamiento interno puede estar compuesto por una, dos o más cadenas polipeptídicas que estén covalentemente (por ejemplo, mediante un enlazador) o no covalentemente asociadas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno puede estar unido a, o ser parte de, una cadena polipeptídica más larga (por ejemplo, un anticuerpo completo, albúmina sérica u otra proteína transportadora) siempre que el agente de plegamiento interno conserve su estructura tridimensional y su disposición para la interacción. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno pueden agregarse a los extremos N o C de otra secuencia polipeptídica que es o no es un plegamiento interno. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se incorporan en la secuencia de otro polipéptido que es o no es un plegamiento interno, separando de este modo la secuencia polipeptídica en dos o más segmentos. En algunas realizaciones, agregar el plegamiento a los extremos N o C o dentro de la secuencia de otro polipéptido que es o no un plegamiento puede permitir al menos uno o más de los siguientes: una disminución de la inmunogenicidad, un vida útil en la circulación aumentada, una degradación más lento *in vivo*, el estímulo de una respuesta inmunitaria local, la interacción con las moléculas del sistema inmunitario, un aumento en el volumen, un aumento en la afinidad por la diana (o dianas) de plegamiento interno, un aumento en la especificidad por la diana (o dianas) de plegamiento interno o el uso de otros protocolos de administración terapéutica/preventiva comúnmente utilizados. En algunas realizaciones, agregar un plegamiento a los extremos N o C o dentro de la secuencia de otro polipéptido que es o no un plegamiento no tiene un efecto directo sobre la unión de un agente de plegamiento a una diana (por ejemplo, un polipéptido HA, la región MPER de un polipéptido HA, N-glucanos en un polipéptido HA, receptores de HA o glucanos sialilados en los receptores de HA).

Los agentes de plegamiento interno se unen a sus sitios de unión diana mediante la interacción con uno o más restos diana. Dichos restos diana son aminoácidos, sacáridos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que se unen a un polipéptido HA, a glucanos unidos en N en un polipéptido HA, a un receptor de HA, a glucanos sialilados en un receptor de HA o diversas combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes polipeptídicos que comprenden un primer agente de plegamiento interno que se une a un polipéptido HA y un segundo agente de plegamiento interno que se une al receptor de HA. En algunas de tales realizaciones, el agente polipeptídico comprende una única cadena polipeptídica que comprende el primer y el segundo plegamiento interno, opcionalmente conectados entre sí por medio de uno o más aminoácidos enlazadores. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno que se une a un receptor de HA interactúa con uno o más glucanos en el receptor de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos sialilados. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a los glucanos sialilados que tienen una topología de tipo paraguas. En determinadas realizaciones, los agentes

de plegamiento interno se unen a glucanos con topología de paraguas con alta afinidad y/o especificidad. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno muestran una preferencia de unión para los glucanos con topología de paraguas en comparación con los glucanos con otras topologías (por ejemplo, glucanos con topología de cono). En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA por la unión de forma que la unión entre el polipéptido HA y el receptor de HA se reduce al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 11 veces, al menos 12 veces, al menos 13 veces, al menos 14 veces, al menos 15 veces, al menos 16 veces, al menos 17 veces, al menos 18 veces, al menos 19 veces o al menos 20 veces. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a glucanos en los receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a un glucano con topología de paraguas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno proporcionado en el presente documento es un agente de bloqueo con topología de paraguas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno proporcionado en el presente documento es un agente de bloqueo específico con topología de paraguas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno tiene una estructura de cadena principal plegada poblada por una pluralidad de restos de aminoácido de unión directa (es decir, restos de aminoácido que hacen contactos directos con aminoácidos o glucanos de la HA), y/o con aminoácidos o glucanos del receptor de HA como se describe en el presente documento.

Restos de interacción: La expresión "restos de interacción", como se usa en el presente documento, se refiere a restos en un agente de plegamiento interno que están diseñados para interactuar con restos diana particulares en un polipéptido diana. En concreto, los restos de interacción se seleccionan y disponen dentro de la secuencia de un agente de plegamiento interno de forma que se presenten en un espacio tridimensional dentro de una distancia (o volumen) predeterminada de los restos diana identificados (por ejemplo, tras la unión, acoplamiento u otros ensayos de interacción). Los restos de interacción pueden ser restos de unión directa.

Aislado: el término "aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente o entidad que (i) se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza o en un contexto experimental); o (ii) se ha producido por la mano del hombre. Las agentes o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los otros componentes a los que estaban asociadas inicialmente. Los agentes aislados pueden estar más del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % puros.

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

Aminoácido natural: Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido natural" se refiere a uno de los veinte aminoácidos de origen natural. Consúltase la Tabla 1 para obtener una lista de estos aminoácidos.

Polipéptido: Como se usa en el presente documento, un "polipéptido", en términos generales, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a los otros mediante de al menos un enlace peptídico. Los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos a veces incluyen aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, sin embargo, son capaces de integrarse, opcionalmente, en una cadena polipeptídica.

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

Oligosacárido corto: Para los fines de la presente divulgación, un oligosacárido se considera normalmente "corto" si tiene menos de 4 o, ciertamente, menos de 3, restos en cualquier cadena lineal.

Especificidad: Como se conoce en la técnica, la "especificidad" es una medida de la capacidad de un ligando particular (por ejemplo, un agente de plegamiento interno) para distinguir a su compañero de unión (por ejemplo, un receptor de HA humana y en particular un receptor de HA humano de las vías respiratorias altas) de otros posibles socios de unión (por ejemplo, un receptor de HA aviar).

Homología sustancial: La frase "homología sustancial" se usa en el presente documento para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen restos homólogos en las posiciones correspondientes. Los restos homólogos pueden ser restos idénticos. Como alternativa, los restos homólogos pueden ser restos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como saben los expertos en la materia, determinados aminoácidos se clasifican normalmente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o como que tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución "homóloga". Las

clasificaciones de los aminoácidos típicas se resumen a continuación en la Tabla 1:

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

5

Tabla 2		
Aminoácidos ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden comparar utilizando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias nucleotídicas y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias aminoacídicas. Se describen programas ejemplares de este tipo en Altschul, *et al.*, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, Methods in Enzymology; Altschul, *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, *et al.*, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente en general proporcionan un indicio del grado de homología. Se considera que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son homólogos en un tramo de restos de interés. El tramo de interés puede ser una secuencia completa. El tramo de interés es al menos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más restos.

Identidad sustancial: La frase "identidad sustancial" se usa en el presente documento para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si contienen restos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden comparar utilizando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias nucleotídicas y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias aminoacídicas. Se describen programas ejemplares de este tipo en Altschul, *et al.*, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, Methods in Enzymology; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, *et al.*, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente en

general proporcionan un indicio del grado de identidad. Se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son idénticos en un tramo de restos de interés. El tramo de interés puede ser una secuencia completa. El tramo de interés puede ser al menos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más restos.

Polipéptido diana: Un "polipéptido diana", como se usa el término en el presente documento, es un polipéptido con el que interactúa un agente de plegamiento interno. Un polipéptido diana puede ser un polipéptido HA. Un polipéptido diana puede ser un receptor de un polipéptido HA.

Resto diana: Un "resto diana", como se usa el término en el presente documento, es un resto dentro de un polipéptido diana con el cual un agente de plegamiento interno está diseñado para interactuar. En concreto, un agente de plegamiento interno se caracteriza normalmente por restos de interacción particulares seleccionados y dispuestos (en virtud de ser presentados en la cadena principal "plegada" seleccionada) para estar dentro de una determinada distancia (o volumen) predeterminada de un resto diana. Un resto diana puede ser o comprende un resto de aminoácido. Un resto diana puede ser o comprende un resto de sacárido.

Agente terapéutico: Como se usa en el presente documento, la frase "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que suscite un efecto biológico o farmacológico deseado.

Tratamiento: Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar, retrasar el inicio, reducir la gravedad o incidencia, o producir la profilaxis de uno o más síntomas o aspectos de una enfermedad, trastorno o afección. Para los fines de la presente invención, el tratamiento se puede administrar antes, durante y/o después del inicio de los síntomas.

Topología de paraguas: La frase "topología de paraguas" se usa en el presente documento para referirse a una disposición tridimensional adoptada por determinados glucanos y, en particular, por glucanos en receptores de HA. La presente divulgación abarca el reconocimiento de que la unión a glucanos con topología de paraguas es característica de los polipéptidos HA que actúan como mediadores en la infección de hospedadores humanos. Como se ilustra en las Figuras 10 y 12, la topología de paraguas normalmente la adoptan solo los glucanos sialilados en $\alpha 2,6$, y es típica de los oligosacáridos largos (por ejemplo, mayores que tetrasacárido). En algunas realizaciones, los glucanos con topología de paraguas son glucanos que presentan una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura presentada en la Figura 10 (panel derecho). En algunas realizaciones, los glucanos con topología de paraguas son glucanos que se ponen en contacto con polipéptidos HA a través de las interacciones con restos de aminoácido específicos. En algunas realizaciones, la topología estructural del glucano se clasifica basándose en el parámetro θ definido como el ángulo entre el C_2 de Sia, el C_1 de Gal y el C_1 de GlcNAc. Los valores de $\theta < 100^\circ$ representan una topología de tipo cono adoptada por los glucanos $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ cortos. Los valores de $\theta > 110^\circ$ representan una topología de tipo paraguas, tal como la topología adoptada por los glucanos $\alpha 2,6$ largos. Un ejemplo de topología de paraguas está dado por el ángulo ϕ del enlace Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal de alrededor de -60° . La Figura 12 presenta determinados ejemplos representativos (aunque no exhaustivos) de glucanos que pueden adoptar una topología de paraguas. Los motivos de $\alpha 2,6$ largos presentados en la Figura 12 incluyen Neu5Ac $\alpha 2,6$ unidos en el extremo no reductor a una cadena larga (por ejemplo, al menos un trisacárido) encontrada como parte de los glucanos unidos en N, en glucanos unidos en O y en glucolípidos biológicos. El recuadro muestra ejemplos de fracciones de glucanos $\alpha 2,6$ largos con topología de paraguas que se encuentran como parte de los glucanos biológicos que se unen con alta afinidad a HA. En algunas realizaciones, los glucanos con topología de paraguas (por ejemplo, en un sitio) comprenden una mayor proporción de ramas de oligosacárido $\alpha 2,6$ largas (por ejemplo, múltiples unidades de lactosamina) que de ramas de $\alpha 2,6$ cortas (por ejemplo, una única lactosamina). Los glucanos con topología de paraguas (por ejemplo, en un sitio) pueden comprender aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o mayor que aproximadamente 50 veces más ramas de oligosacáridos $\alpha 2,6$ largas que ramas $\alpha 2,6$ cortas (por ejemplo, lactosamina única). La característica singular de las interacciones de la HA con glucanos con topología de paraguas y/o señuelos de glucano es el contacto de la HA con un glucano que comprende ácido siálico (AS) y/o análogos de AS en el extremo no reductor. La longitud de la cadena del oligosacárido puede ser al menos de un trisacárido (excluyendo el SA o el análogo de SA). Los glucanos con topología de paraguas son oligosacáridos con la siguiente forma:

Neu5Ac $\alpha 2,6$ Sug1-Sug2-Sug3

en que:

- (a) Neu5Ac $\alpha 2,6$ está normalmente (pero no esencialmente) en el extremo no reductor;
- (b) Sugl:

- (i) es una hexosa (frecuentemente Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β - para la extensión unida en N y O y α - en el caso de GalNAc α - que está unida en O a la glicoproteína);
- (ii) no hay azúcares distintos de Neu5Ac $\alpha 2,6$ unidos a ninguna de las posiciones no reductoras de Sugl (excepto

cuando Sug1 es GalNAc α -, que está unido en O a la glucoproteína); y/o

(iii) las fracciones no azúcar tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc. pueden estar unidas a posiciones no reductoras (normalmente la posición 6) de Sug1 (por ejemplo, para mejorar los contactos con la HA);

(c) Sug2 y/o Sug3 es/son:

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

(ii) las fracciones de azúcares (tales como Fuc) o no azúcar tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc. pueden estar unidas a posiciones no reductoras de Sug2, Sug3 y/o Sug4;

(d) El enlace entre dos azúcares cualesquiera en el oligosacárido aparte del enlace Neu5Ac α 2,6 puede ser 1-2, 1-3, 1-4 y/o 1-6 (normalmente, 1-3 o 1-4); y/o

(e) La estructura en que Neu5Ac α 2,6 está unido GalNAc α que está unido en O a la glucoproteína y los azúcares adicionales están unidos al extremo no reductor de GalNAc α , por ejemplo

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

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

Aminoácido no natural: Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido no natural" se refiere a cualquier aminoácido, aminoácido modificado y/o análogo de aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos naturales. Consúltase la Patente de Estados Unidos N.º 7.045.337, la Patente de Estados Unidos N.º 7.385.028 y la Patente de Estados Unidos N.º 7.332.571. Como se usa en el presente documento, "aminoácido no natural" también abarca aminoácidos químicamente modificados, incluyendo, pero sin limitación, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, incluyendo los aminoácidos carboxi y/o amino terminales en péptidos, puede modificarse mediante pegilación, metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos que no afecten negativamente la actividad del agente de pegamiento interno. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. El término "aminoácido" se usa indistintamente con "resto de aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y/o a un resto de aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o a un resto de un péptido.

Agente antigripal universal: Como se usa en el presente documento, la expresión "agente antigripal universal" se refiere a un agente que tiene una neutralización de amplio espectro entre cepas, grupos, clados y clústeres del virus de la gripe (véanse las definiciones de "amplio espectro" más arriba y la Figura 19).

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

Variante: Como se usa en el presente documento, el término "variante" es un término relativo que describe la relación entre un polipéptido particular (por ejemplo, un polipéptido HA) de interés y un polipéptido "parental" con el que se compara su secuencia. Se considera que un polipéptido de interés es una "variante" de un polipéptido parental si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del parental a excepción de un pequeño número de modificaciones de la secuencia en posiciones particulares. Normalmente, menos del 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % de los restos de la variante están sustituidos en comparación con el parental. En algunas realizaciones, una variante tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 resto sustituido en comparación con un parental. A menudo, una variante tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1) de restos funcionales sustituidos (es decir, restos que participan en una actividad biológica particular). Adicionalmente, una variante normalmente no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adición o delección, y a menudo no tiene adiciones o delecciones, en comparación con el parental. Además, cualquier adición o delección es normalmente menor de aproximadamente 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 10, 9, 8, 7, 6 y comúnmente es menor de aproximadamente 5, 4, 3 o 2 restos. En algunas realizaciones, el polipéptido original es uno que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido HA parental puede ser uno encontrado en un aislado natural (por ejemplo, de tipo silvestre) de un virus de la gripe (por ejemplo, un polipéptido HA de tipo silvestre).

Vector: Como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se lo ha unido. Los vectores son capaces de replicación extracromosómica y/o de expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula hospedadora tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes unidos de operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Tipo silvestre: Como se entiende en la técnica, la frase "tipo silvestre" generalmente se refiere a una forma normal de

una proteína o ácido nucleico, como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, los polipéptidos HA de tipo silvestre se encuentran en aislados naturales del virus de la gripe. Se puede encontrar una diversidad de distintas secuencias de HA de tipo silvestre en la base de datos de secuencias de virus de la gripe del NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>.

Descripción detallada de determinadas realizaciones particulares de la invención

Polipéptido de hemaglutinina (HA)

Los virus de la gripe son virus de ARN que se caracterizan por una envoltura de membrana lipídica que contiene dos glucoproteínas, un polipéptido hemaglutinina (HA) y un polipéptido de neuraminidasa (NA), incluidos en la membrana del virus particular. Hay 16 subtipos de polipéptidos HA conocidos (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16) y 9 subtipos de polipéptidos NA (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9), y las distintas cepas gripales se nombran basándose en el número de subtipos del polipéptido HA y el polipéptido NA de la cepa, en donde hay distintas combinaciones de un subtipo del polipéptido HA combinado con un subtipo del polipéptido NA (por ejemplo, H1N1, H1N2, H1N3, H1N4, H1N5, etc.).

Basándose en comparaciones de identidad de secuencia de aminoácidos y de las estructuras cristalinas, los subtipos de los polipéptidos HA se han dividido en dos grupos principales y cuatro clados más pequeños, que se dividen adicionalmente en cinco grupos (Figura 19). Los distintos subtipos del polipéptido HA no necesariamente comparten una fuerte identidad de secuencia de aminoácidos, pero las estructuras tridimensionales globales de los distintos subtipos del polipéptido HA son similares entre sí, con varias diferencias sutiles que pueden utilizarse a fines de clasificación. Por ejemplo, la orientación particular de los subdominios distales de membrana en relación con una hélice α central es una característica estructural comúnmente utilizada para determinar el subtipo del polipéptido HA (Russell *et al.*, *Virology*, 325:287, 2004).

Los polipéptidos HA maduros están compuestos por dos dominios, (1) un dominio central HA-1 conocido como dominio de unión a ácido siálico y (2) el tallo transmembrana de la HA, conocido como dominio HA-2. HA-1 contiene el sitio de unión para glucanos y se cree que HA-1 es responsable de actuar como mediador en la unión de la HA al receptor de HA. HA-2 es responsable de presentar el dominio HA-1.

Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, el análisis de las secuencias de la HA de todos los subtipos gripales mostró un conjunto de aminoácidos en la interfaz de los dominios HA-1 (tallo) y HA-2 (cabeza) que están bien conservados y son accesibles a las posibles moléculas terapéuticas (Figura 13). Los estudios también han observado la excelente conservación de amplio espectro de la región epitópica proximal de membrana (MPER) de la interfaz HA-1/HA-2 que incluye la hélice α canónica y los restos en su vecindad (Ekiert *et al.*, *Science*, 324(5924):246, 2009; Sui *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* 16(3):265, 2009) (Figura 2).

Se han desarrollado anticuerpos contra la región epitópica proximal de membrana (MPER) altamente conservada de la HA, que incluyen el Fab de CR6261 (Ekiert *et al.*, *Science*, 324 (5924): 246, 2009) y el scFv de F10 (Sui *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* 16 (3): 265, 2009) (Figura 3). Si bien estos anticuerpos tienen éxito en la neutralización del clado del grupo 1 de las cepas del virus de la gripe A (H1, H2, H5, H9), son ineficaces contra las cepas del grupo 2 que están glucosiladas en N en la proximidad de su MPER (Ekiert *et al.*, *Science*, 324(5924):246, 2009; Sui *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* 16(3):265, 2009). Estas cepas del grupo 2 incluyen H3 del virus de la gripe A, H7 y H10 que están glucosilados en Asn-38 del dominio N terminal de HA-1, así como todo el clado de virus de la gripe B que están glucosilados en Asn-238 del dominio C terminal de HA-1. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores proponen que las N-glucosilaciones impiden que las moléculas grandes basadas en anticuerpos, tales como las IgG, los mAAb y los scFv accedan al epítipo subyacente, limitando de este modo su aplicación de amplio espectro (Figura 4).

Receptores de HA

Los polipéptidos HA interactúan con la superficie de las células al unirse a un receptor glucoproteína, conocido como el receptor de HA. La unión de un polipéptido HA a un receptor de HA está mediada predominantemente por glucanos unidos a N en los receptores de HA. En concreto, los polipéptidos HA en la superficie de las partículas del virus de la gripe reconocen los glucanos sialilados que están asociados con los receptores de HA en la superficie del hospedador celular. Después de reconocimiento y la unión, la célula hospedadora envuelve al viral y el virus puede replicarse y producir muchas más partículas de virus para distribuirse a las células vecinas.

Los polipéptidos HA existen en la membrana vírica como un homotrímero de uno de los 16 subtipos, denominado H1-H16. Solo tres de estos subtipos (H1, H2 y H3) se han adaptado hasta ahora para la infección humana. Una característica informada de los polipéptidos HA que se han adaptado para infectar a los seres humanos (por ejemplo, los polipéptidos HA de los subtipos pandémicos del virus de la gripe H1N1 (1918) y H3N2 (1967-68)) es su capacidad para unirse preferentemente a glucanos sialilados en α 2,6 en comparación con sus progenitores aviares que se unen preferentemente a glucanos sialilados en α 2,3 (Skehel y Wiley, *Annu Rev Biochem*, 69:531, 2000; Rogers, y Paulson, *Virology*, 127:361, 1983; Rogers *et al.*, *Nature*, 304:76, 1983; Sauter *et al.*, *Biochemistry*, 31:9609, 1992; Connor *et al.*, *Virology*, 205:17, 1994; Tumpey *et al.*, *Science*, 310:77, 2005). Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en

particular, se ha propuesto que la capacidad de infectar hospedadores humanos se correlaciona menos con la unión a los glucanos de un enlace particular y más con la unión a glucanos de una topología particular. Los inventores han demostrado en concreto que los polipéptidos HA que actúan como mediadores en la infección de seres humanos se unen a glucanos con topología de paraguas, a menudo mostrando preferencia por glucanos con topología de paraguas sobre los glucanos con topología de cono (aunque los glucanos con topología de cono pueden ser glucanos sialilados en α 2,6) (Véanse, por ejemplo, los documentos USSN 12/348.266 presentado el 2 de enero de 2009, USSN 12/301.126, presentado 17 de noviembre de 2008, USSN 61/018.783, presentado jueves, 3 de enero de 2008, USSN 11/969.040, presentado jueves, 3 de enero de 2008, USSN 11/893.171, presentado martes, 14 de agosto de 2007, USSN 60/837.868, presentado el 14 de agosto de 2006, USSN 60/837.869, presentado el 14 de agosto y a la solicitud PCT PCT/US07/18160, presentada el 14 de agosto de 2007.

Están disponibles varias estructuras cristalinas de polipéptidos HA de H1 (humano y porcino), los subtipos H3 (aviar) y H5 (aviar) unidos a oligosacáridos sialilados (de enlaces α 2,3 y α 2,6), y proporcionan información molecular sobre los aminoácidos específicos que están implicados en distintas interacciones de los polipéptidos HA con estos glucanos (Eisen *et al.*, Virology, 232:19, 1997; Ha *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 98:11181, 2001; Ha *et al.*, Virology, 309:209, 2003; Gamblin *et al.*, Science, 303:1838, 2004; Stevens *et al.*, Science, 303:1866, 2004; Russell *et al.*, Glycoconj J 23:85, 2006; Stevens *et al.*, Science, 312:404, 2006). Se han identificado y se presentan en la Tabla 3 algunas estructuras cristalinas de interacciones ejemplares HA-glucano:

Tabla 3. Estructuras cristalinas de complejos de HA-glucano

Abreviatura (ID de PDB)	Cepa del virus	Glucano (con coordenadas asignadas)
ASI30_H1_23 (1RV0)	A/Swine/Iowa/30 (H1N1)	Neu5Ac
ASI30_H1_26 (1RVT)	A/Swine/Iowa/30 (H1N1)	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc
APR34_H1_23 (1RVX)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc
APR34_H1_26 (1RVZ)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc
ADU63_H3_23 (1MQM)	A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	Neu5Ac α 3Gal
ADU63_H3_26 (1MQN)	A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	Neu5Ac α 6Gal
AAI68_H3_23 (1HGG)	A/Aichi/2/68 (H3N2)	Neu5Ac α 3Gal β 4Glc
ADS97_H5_23 (1JSN)	A/Duck/Singapore/3/97 (H5N3)	Neu5Ac α 3Gal β 3GlcNAc
ADS97_H5_26(1JSO)	A/Duck/Singapore/3/97 (H5N3)	Neu5Ac
Viet04_H5 (2FK0)	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	

Los complejos de HA - glucano sialilado en α 2,6 se generaron mediante la superposición del trazado de CA de la subunidad HA-1 de ADU63 H3 y ADS97 H5 y Viet04_H5 en ASI30_H1_26 y APR34_H1_26 (HI). Aunque se han publicado los complejos estructurales de A/Aichi/2/68 (H3N2) humano con glucanos sialilados en α 2,6 (Eisen *et al.*, 1997, Virology, 232:19), sus coordenadas no estaban disponibles en el Protein Data Bank. Se utilizó el programa SARF2 (<http://123d.ncifcrf.gov/sarf2.html>) para obtener la alineación estructural de las distintas subunidades HA-1 para la superposición.

Por ejemplo, las estructuras cristalinas de H5 (A/pato/Singapur/3/97) solas o unidas a un oligosacárido sialilado en α 2,3 o α 2,6 identifican determinados aminoácidos que interactúan directamente con los glucanos unidos, y también aminoácidos que están a uno o más grado de separación (Stevens *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98:11181, 2001). En algunos casos, la conformación de estos restos es distintas en los estados unido frente a no unido. Por ejemplo, Glu190, Lys193 y Gln226 participan en interacciones de unión directa y tienen conformaciones distintas en el estado unido frente al no unido. La conformación de Asn186, que es proximal a Glu190, también es significativamente distinta en el estado unido frente al no unido.

Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, se cree que los receptores de HA están modificados por los glucanos sialilados en α 2,3 o α 2,6 cerca del sitio de unión al polipéptido HA del receptor, y que el tipo de enlace del glucano unido al receptor puede afectar la conformación del sitio de unión al polipéptido HA del receptor, afectando así la especificidad del receptor por distintos polipéptidos HA. Por ejemplo, el bolsillo de unión a glucano del receptor de HA aviar es estrecho. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, se ha propuesto que este bolsillo se une a la conformación *trans* de glucanos sialilados en α 2,3 y/o a glucanos con topología de cono, ya sea unidos en α 2,3 o α 2,6 (Figuras 10-12).

Los receptores de HA en los tejidos aviares, y también en los tejidos del tracto gastrointestinal (GI) y de áreas distales del pulmón humanos se caracterizan por enlaces de glucano sialilado en α 2,3, y además se caracterizan por glucanos, incluidos los glucanos sialilados en α 2,3 y/o sialilados en α 2,6, que predominantemente adoptan topologías de cono. Los receptores de HA que tienen tales glucanos con topología de cono pueden denominarse en el presente documento los CTHAr.

Por el contrario, los receptores de HA humanos en los bronquios y la tráquea de las vías respiratorias altas) están modificados por glucanos sialilados en α 2,6. A diferencia del motivo α 2,3, el motivo α 2,6 tiene un grado adicional de

libertad de conformacional debido al enlace C6-C5 (Russell *et al.*, Glycoconj J23:85, 2006). Los polipéptidos HA que se unen a tales glucanos sialilados en $\alpha 2,6$ tienen un bolsillo de unión más abierto para adaptarse a la diversidad de estructuras que surgen de esta libertad conformacional. Además, de acuerdo con la presente invención, los polipéptidos HA pueden necesitar unirse a los glucanos (por ejemplo, glucanos sialilados en $\alpha 2,6$) en una topología de paraguas, y particularmente puede necesitar unirse a tales glucanos con topología de paraguas con fuerte afinidad y/o especificidad, para actuar como mediadores de forma eficaz en la infección de los tejidos de las vías respiratorias altas humanas. Los receptores de HA que tienen glucanos con topología de paraguas pueden denominarse en el presente documento los UTHAr.

Como resultado de estos perfiles de glucosilación espacialmente restringidos, los seres humanos habitualmente no se infectan por virus que contienen muchos polipéptidos HA aviares de tipo silvestre (por ejemplo, H5 aviar). En concreto, debido a que las partes de las vías respiratorias humanas que tienen más probabilidades de encontrarse con virus (es decir, la tráquea y los bronquios) carecen de receptores con glucanos en cono (por ejemplo, los glucanos sialilados en $\alpha 2,3$ y/o los glucanos cortos) y los polipéptidos HA aviares de tipo silvestre normalmente se unen principalmente o exclusivamente a los receptores asociados con los glucanos cónicos (por ejemplo, glucanos sialilados en $\alpha 2,3$ y/o glucanos cortos), los seres humanos rara vez se infectan con virus aviares. Solo cuando están en contacto suficientemente cercano con virus que puede acceder a los receptores de áreas distales del pulmón y/o del tracto gastrointestinal que tienen glucanos de paraguas (por ejemplo, glucanos sialilados en $\alpha 2,6$ largos) es que los humanos se infectan.

Agentes de plegamiento interno

Estructura del agente de plegamiento interno

Como se describe en el presente documento, los agentes de plegamiento interno son, generalmente, agentes polipeptídicos que se unen a un sitio de unión seleccionado. Un agente de plegamiento interno tiene una estructura caracterizada por una cadena principal "plegada" poblada por restos de interacción seleccionados y dispuestos de manera que, cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión, los restos de interacción individuales se colocan dentro de una distancia o volumen preseleccionado de restos diana afines.

Se conoce en la técnica una diversidad de estructuras "plegadas" polipeptídicas, utilizadas apropiadamente como estructuras de cadena principal de agentes de plegamiento interno de acuerdo con la presente invención. Es decir, es bien sabido que las cadenas lineales de aminoácidos adoptan estructuras secundarias y terciarias discretas, de forma que los aminoácidos son proximales en el espacio, pero distales en secuencia. Por ejemplo, plegamientos secundarios comunes incluyen la hélice α , la lámina β , la hélice de poliprolina, hélice 3_{10} y giros. Los plegamientos terciarios comunes incluyen los de tipo ferredoxina (4,45 %), barril TIM (3,94 %), bucle P que contiene nucleótido trifosfato hidrolasa (3,71 %), dominio catalítico de proteínas quinasas (PK) (3,14 %), dominios del plegamiento de Rossmann de unión a NAD(P) (2,80 %), haz de 3 hélices de unión a DNA:ARN (2,60 %), superhélice α - α (1,95 %), metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina (1,92 %), propulsor beta de 7 hojas (1,85 %), α : β hidrolasas (1,84 %), transferasa dependiente de PLP (1,61 %), nucleótido adenina α -hidrolasa (1,59 %), de tipo flavodoxina (1,49 %), sándwich β de tipo inmunoglobulina (1,38 %) y de tipo receptor de glucocorticoides (0,97 %), en que los valores entre paréntesis son los porcentajes de las proteínas comentadas que adoptan los plegamientos respectivos (véase, por ejemplo, Zhang *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 58:72, 2001).

Los agentes de plegamiento interno descritos en el presente documento pueden tener una estructura de cadena principal plegada basada en una proteína seleccionada del grupo que consiste en: la región extracelular del factor tisular humano, tenascina, neuroglian, molécula de adhesión celular neural 1 (NCAM), subunidad de beta-4 integrina, receptor de hormona de crecimiento, receptor de eritropoyetina (EPO), receptor de prolactina, cadena alfa del receptor de interleucina 4, cadena beta de receptores GM-CSF, cadena beta de receptores de IL-3, cadena beta de receptores de IL-5, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (GC-SF), contactina 3 (KIAA1496), precursor de brother of CDO (BOC), cadena alfa del receptor del interferón gamma, dominios de unión a citocinas del receptor de citoquinas gp130, receptor 1 de interleucina 10 (IL-10R1), módulo de titina tipo 1, el dominio p40 de interleucina 12 (cadena beta de IL-12), cadena alfa del receptor de interleucina 6, cadena beta del receptor de interferón alfa/beta, proteína KIAA1568, proteína KIAA0343, proteína KIAA1355, receptor alfa del factor neurotrófico ciliar, factor de célula hospedadora 2 (HCF-2), proteína de dominios de repetición de anquirina 1 (FANK1), receptor 1 de efrina tipo B, receptor 8 de efrina tipo A, cadena gamma común del receptor de citocinas, proteína de unión a rim 2, cadena beta del receptor de interleucina 2, tenascina X, proteína-tirosina fosfatasa delta de tipo receptor (PTPRD), sidekick 2, neogenina, proteína similar a molécula de adhesión celular del síndrome de down 1 (DSCAML1), proteína de unión a miosina C (tipo rápido), proteína-tirosina fosfatasa F de tipo receptor (PTPRF), receptor hedgehog iHog, receptor 1 de efrina tipo A.

Los agentes de plegamiento interno descritos en el presente documento pueden tener una cadena principal plegada de anticuerpo. Varios agentes de plegamiento interno ejemplificados en el presente documento (véase, por ejemplo, la Tabla 9, por ejemplo, (Plegamiento interno 23 a Plegamiento interno 40) tienen una cadena principal plegada de anticuerpo. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno descritos en el presente documento tienen una cadena principal plegada de dominio de sándwich β .

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno de la invención se caracterizan por la presencia de restos de interacción seleccionados y dispuestos para interactuar con restos diana particulares en un polipéptido HA y/o un receptor de HA. Por ejemplo, las tablas 4 y 5 presentan determinados conjuntos de restos diana representativos para polipéptidos HA (glucosilados o no glucosilados); Tabla 4) y para el receptor de HA (específicamente el receptor de HA que contiene glucanos sialilados; Tabla 5), también véanse las Figuras 5 y 9.

Tabla 4

Conjuntos de restos diana ejemplares de polipéptido HA (ejemplificado con la numeración de HA H3 de ID de PBD 1HGG)	
Conjunto D1	Trp-2 1, Ile-48, Ile-45, Met-320
Conjunto D2	Val-20, Leu-38
Conjunto D3	Thr-37, Thr-41
Conjunto D4	His-18
Conjunto D5	Lys-121, Lys-39
Conjunto D6	Asp-19, Gln-42, Asp-46, Gln-47, Asn-49, Asn-53, Asn-38
Conjunto D7	Thr-318, Thr-40
Conjunto D8	Leu-52, Leu-42, Ile-56, Pro-293
Conjunto D9	His-56
Conjunto D10	Lys-58, Lys-292
Conjunto D11	Asn-290, Asp-291, Glu-57, Glu-61, Glu-280
Conjunto D12	Ser-279, Thr-59
<u>Conjuntos de restos diana ejemplares de glucanos del polipéptido HA</u>	
Conjunto D14	N-glucanos en polipéptidos HA. En algunas realizaciones, los N-glucanos en los polipéptidos HA están cerca o proximales a la región MPER

Tabla 5

Conjuntos de restos diana ejemplares del receptor de HA	
Conjunto D13	Ácido siálico en los glucanos del receptor de HA

La presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que contienen restos de interacción que se unen a estos conjuntos de dianas.

Por ejemplo, la Tabla 6 proporciona conjuntos de restos de interacción del plegamiento interno que se pueden utilizar en agentes de plegamiento interno de la invención diseñados para interactuar con polipéptidos HA y/o con receptores de HA de acuerdo con las reglas establecidas en la Tabla 7:

Tabla 6

<u>Conjuntos ejemplares de restos de interacción del plegamiento interno</u>	
Conjunto Ple1	Ile, Leu, Val, Phe, Met, Trp, Tyr, Pro, His
Conjunto Ple2	Val, Phe, Trp, Tyr, Asp, Arg, Lys
Conjunto Ple3	Ile, Leu, Phe, Met, Trp, Tyr, His, Gln, Asp, Arg
Conjunto Ple4	Asp, Glu, Phe, Met, Tyr, Trp
Conjunto Ple5	Arg, Lys, His, Asn, Gln, Thr
Conjunto Ple6	Tyr, Trp, Phe, His, Arg, Gln, Ser
Conjunto Ple7	Tyr, Trp, Phe, Pro, Arg, Asp, His, Lys

Tabla 7

<u>Estructuras de plegamiento interno ejemplares</u>	
Conjunto de restos diana	Restos de interacción del plegamiento interno presentados dentro de 5 Å de los restos diana durante la unión o tras el acoplamiento
Conjunto D1	Conjunto Ple1
Conjunto D2	Conjunto Ple1
Conjunto D3	Conjunto Ple2
Conjunto D4	Conjunto Ple3
Conjunto D5	Conjunto Ple4
Conjunto D6	Conjunto Ple5
Conjunto D7	Conjunto Ple2
Conjunto D8	Conjunto Ple1
Conjunto D9	Conjunto Ple3
Conjunto D10	Conjunto Ple4
Conjunto D11	Conjunto Ple5
Conjunto D12	Conjunto Ple2
Conjunto D13	Conjunto Ple6
Conjunto D14	Conjunto Ple7

Como alternativa o adicionalmente, los agentes de plegamiento interno son polipéptidos caracterizados por una o más características estructurales expuestas en las Tablas 4-8 y/o en las Figuras 5, 13 y/o 14.

- 5 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados en el presente documento contienen uno o más de los elementos de secuencia de restos de interacción definidos en cada cuadro de la Tabla 8. Cada cuadro define un elemento de secuencia, en donde los aminoácidos enumerados en cada cuadro son restos de interacción que son adyacentes entre sí o están separados por uno o dos aminoácidos en la cadena polipeptídica del agente de plegamiento interno.

10

Tabla 8

<u>Restos de interacción definidos para la unión de la MPER del polipéptido HA y los glucanos sialilados</u>					
Diana	Restos de interacción en los agentes de plegamiento interno				
MPER del polipéptido HA	(I/V) y (M/C)	(F/Y) y (M/C)	(D/E) y W	(S/T) y (M/C)	(I/V/L) y N
	(F/Y) y N	(M/C) y N	(F/Y) e (I/V/L)	W y N	(F/Y) y W
	(S/T) y (I/V/L)	(D/E) y (I/V/L)	(D/E) y (M/C)	(D/E) y (F/Y)	(S/T) y W
	(I/V/L) y W	(S/T) y (F/Y)	(H/K/Q) e (I/V/L)	(H/K/Q) y (F/Y/P)	(H/K/Q) y (W/M)
MPER del polipéptido HA glucosilado en N	(Y/W/F/P) y (R/D/H/K/E/Q/N)		H/P/F/W/Y		
Glucanos sialilados (por ejemplo, en los receptores de HA)	(S/W/F)		H/R/Q/S		

Los agentes de plegamiento interno proporcionados tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la de un agente de plegamiento interno expuesta en la Tabla 9. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la de un agente de plegamiento interno de la Tabla 9.

15

5

En la Tabla 9 se proporciona un listado de agentes de plegamiento interno particulares diseñados para unirse a la MPER de la HA (por ejemplo, de amplio espectro, glucosilada y no glucosilada). De acuerdo con la presente invención, los inventores descubrieron que menos del 10 % de los aminoácidos contribuyen a la unión de la HA. La presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que tienen más del 50 % de identidad de secuencia por pares con cualquiera de las secuencias de agentes de plegamiento interno enumeradas a continuación en la Tabla 3. En particular, la presente invención proporciona tales agentes de plegamiento interno cuya estructura sigue adicionalmente las reglas o parámetros expuestos en una cualquiera de las Tablas 4-8 y las Figuras 5 y 13.

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de los plegamientos internos y sus dianas de unión de proteína/glucano.

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 1	MEHPVATLSTVERRAINLTWTKPFDGNSPLIRYILEM SENNAPWTVLLASVDPKATSVTVKGLVPARSYQFRL CAVNDVGKGQFSKDERVSLPE (SEQ ID NO:1)	Sí	Sí	No
Plegamiento interno 2	MPSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPWTMSSRYR RITYGETGGNSPVQEFTVPGFMGGKSTATISGLKPGV DYTITVYAVYGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQGGG (SEQ ID NO:2)	Sí	No	No
Plegamiento interno 3	MEHPVATLSTVERRAIQLTWDAPVTTSSRRYILEMSE NNAPWTVLLTVPGFMGGKTSVTVKGLVPARSYQFR LCAVNYVGKGQFSKDERVSLPE (SEQ ID NO:3)	Sí	Sí	No
Plegamiento interno 4	MVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPVTTSSRRYRITYGE TGGNSPVQEFTVPGFMGGKSTATIRGLKPGVDYITV YAVYGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQGGG (SEQ ID NO:4)	Sí	No	No
Plegamiento interno 5	MGSLEVVAASGADSLISWDAPFTIYSRRYRITYHVE KNGSKYGPDGLPYLQEFTVPGFMGGKSTATIRNVTE DDYTITVYAVYGRGDSPASSKPISINYRTDV (SEQ ID NO:5)	Sí	No	No
Plegamiento interno 6	MSPSIDQVEPYSSSTAQVQFKRPSRTVPIYHYKAEWRA VGEEVWHKWPFRIGGKGIVTIVGLKPETTYAVRL AAFTGSGGRSSAASEFKTQP (SEQ ID NO:6)	Sí	No	No
Plegamiento interno 7	MAGSPANASTSGGDVEFTCRVFTDYPHIQWILHVEY LKVLTAAAYKKRKETLYIRNVTEDEAGEYTCLAGNNEG ISFHSAWLTVLP (SEQ ID NO:7)	Sí	No	No
Plegamiento interno 8	MGSPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDPFTISFVTVSWN SGALTSGVHTPGYKKSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH YGKPSNTKVDKRVE (SEQ ID NO:8)	Sí	No	No
Plegamiento interno 9	MVYELQVQKSVTVQEGLCVLPFSFSSEVTFSSFYV YWFRDGGHGYAEVVATISPMFGTPNYAPETQGRFR LLGDVQKKNCSLSIGDARMEDTGSYFFRVERGYICS GGTCRDVKYSYQQNKLNLVETALI (SEQ ID NO:9)	Sí	Sí	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 10	MVYELQVQKSVTVQEGLCVLVPCSFSSSEVTFSSFYV YWFRDGGHGYAAEVFYTTSPGFMGGKNCSLSIGDA RMEDTGSYFFRVERGYICSGGTCRDVKYSYQQNKLN LEVT (SEQ ID NO:10)	Sí	Sí	No
Plegamiento interno 11	MEVQLVESGGGLVKAGGSLILSCGVSNVTISSHTMN WVRRVPGGGLEWVASISTMFTYRDYADAVKGRFTV SRDDLEDFVYLQMHKMRVEDTAIYYCARSPSYICSG GTCVFDAGWPGTVVTVSSGGGSGGGSGGGGIQPGM TQSPSTLSASVGDITITCRASQSIETWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASTLKTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLQ FDDFATYHCQHYAGYSATFGQGTRVEIK (SEQ ID NO:11)	Sí	No	Sí
Plegamiento interno 12	MEVQLVESGGGLVKAGGSLILSCGVSNVTISSHTMN WVRRVPGGGLEWVASISTMFTYRDYADAVKGRFTV SRDDLEDFVYLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLS DNDPFDAGWPGTVVTVSSGGGSGGGSGGGGIQPGM TQSPSTLSASVGDITITCRASQSIETWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASTLKTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLQ FDDFATYHCQHYAGYSATFGQGTRVEIK (SEQ ID NO:12)	Sí	No	Sí
Plegamiento interno 13	MVQLVEAGGGLVKAGGSLDLRCGVSNVTISSHTMN WKRRVPGGGTESVASISTMFTYTAYADAVKGRFTVS RADLEDVSLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLSD NDPFDAGWPGTVVTVSP (SEQ ID NO:13)	Sí	No	No
Plegamiento interno 14	MVQLVESGGGLVGSTSSLILSCGVSNFYIHSHTMNW VRRAPSAGLEWVASISTFVYYRDYAQSVASAFTVSR DTRQEFVYLQMASMVAQVSAIYYCARKGSAVLSDN DPFDAGWPGTVVTVSP (SEQ ID NO:14)	Sí	No	Sí
Plegamiento interno 15	MQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCTSSSEVTFSSFTISW VRQAPGQGLEWLGISTMFGTPNYAQKFQGRVTITA DQSTRTAYMDLRSLRSEDTAVYYCARKGSDRLSDN DPFDHWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)	Sí	No	Sí
Plegamiento interno 16	MPSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWATTGKASSLYYR ITYGETGGNSPVQEFTVPAFMGGWVKATIRGLKPGV DYTITVYAVYHYGGSDDTLSPISINYRTEIDKPSQGG (SEQ ID NO:16)	Sí	No	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 17	MRDLEVVAATPTSLLISWDAPVTTSSRYIIEMSETN APWTVLFTVPGFMGGKSTATISGLKPGVDYTFRVCA VNYVGKGQFSKDTENVRLI (SEQ ID NO:17)	Sí	Sí	No
Plegamiento interno 18	MRDLEVVAATPTSLLISWDAPVTTVSTYRITYGETGG NSPVQEFTVSTMGGTPNYAQKFQGRVTITAGTWGKS TATISGLKPGVDYTITVYRKGSDRLSNDPSSKPISIN YRTEI (SEQ ID NO:18)	Sí	No	Sí
Plegamiento interno 19	MRDLEVVAATPTSLLISWDAPVTTVSTYYIIEMSETN APWTVVEFTVSTMGGTPNYAQKFQGRVTITAGTWG- KSTATISGLKPGVDYTFRVCAVRKGSDRLSNDPSSK PISINYRTEI (SEQ ID NO:19)	Sí	Sí	Sí
Plegamiento interno 20	MPPAVQHLLTA EVTADSGEYQVLARWRYPKDRKYQS FLQRLTVTADDGSERLVSTARTRETTYRFTQLALGN YRLTVRAVNAWRQQGPASVSFRIAAP (SEQ ID NO:20)	Sí	No	No
Plegamiento interno 21	MGPQGFPWRLHVTGLTTSTTELAWDPPKYSEHNIFIR SYTVVFRDINSQQELQNITDGRGEFTLTGLKPDTTYDI KVRAWTYTRSGPLSPSIQSRTMP (SEQ ID NO:21)	Sí	No	No
Plegamiento interno 22	MEHPVATLSTVERRAIQLTWDAPVTTSSRRYILEMSE NNAPWTVLLTVPGFMGGKTSVTVKGLVPARSYQFR LSAVNYVGKGQYSKDERVSLPEEPPTAPPQNVIASG RTNQSIMIQWQPPESHQNGILKGYIIRYNNAGNPVG YQFKNITDADVNNLLLEDLTSGTNYEIEVAAYNSAG LGVYSSKVTEWTLQ (SEQ ID NO:22)	Sí	Sí	No
Plegamiento interno 23	Cadena 1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIMDTYIHWRQAPG KGLEWVARIFPLFGYTRYADSVKGRFTISARLWKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGGRKFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEP (SEQ ID NO:23) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 23	Cadena 1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIMDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIFPLFGYTRYADSVKGRFTISARLWKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGRKFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP (SEQ ID NO:23) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 24	Cadena 1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFAISWVRQAPGKGLEWVAGISPMFGTPNYADSVKGRFTISADQSTRTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSYICSGGTCVFDHWGQGTLLTVS (SEQ ID NO:25) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 25	Cadena 1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGS AISWVRQAPGKGLEWVAGISPMFGTPNYADSVKGRFTISADQSTRTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSYICSGGTCVFDHWGQGTLLTVS (SEQ ID NO:26) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 26	Cadena 1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGS AISWVRQAPGKGLEWVAGISPMFGTPNYADSVKGRFTISADGSSGTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSYICSGGTCVFDHWGQGTLLTVS (SEQ ID NO:27) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 27	Cadena 1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFAISWV RQAPGKGLEWVAGISPMMGHPNYADSVKGRFTISA DQSTRAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSYICMQM TCVFDHWGQGTLTVTS (SEQ ID NO:28) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 28	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFALTWV RQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYSDSVKGRFTISAD QSTRAYLQMNTLRAEDSAMYCARSPSYICSGGTC VFDHWGQGTTTVTS (SEQ ID NO:29) Chain2:DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISL LQPEDFATYYCQQHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 29	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT WVRQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYSDSVKGRFTIS ADQSTRAYLQMNTLRAEDSAMYCARSPSYICSGG TCVFDHWGQGTTTVTS (SEQ ID NO:30) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 30	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT WVRQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYSDSVKGRFTIS ADGSSGTAYLQMNTLRAEDSAMYCARSPSYICSGG TCVFDHWGQGTTTV (SEQ ID NO:31) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 31	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFALTWV RQPPGKAMEWVAGISPMMGHPNYSDSVKGRFTISAD QSTRTAYLQMNTLRAEDSAMYYCARSPSYICMQMT CVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:32) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SE Q ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 32	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFALTWV RQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYSDSVKGRFTISAD GSSGTAYLQMNTLRAEDSAMYYCARSPSYICSGGTC VFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:33) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SE Q ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 33	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFALTWV RQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYSDSVKGRFTISAD QSTRTAYLQMNTLRAEDSAMYYCARSPSYICMQMT CVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:34) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SE Q ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 34	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFALTWV RQPPGKAMEWVAGISPMMGHPNYSDSVKGRFTISAD QSTRTAYLQMNTLRAEDSAMYYCARSPSYICSGGTC VFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:35) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SE Q ID NO:24)	Sí	No	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 35	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT WVRQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYS DSVKGRFTIS ADQSTR TAYLQMNTLRAEDSAMY YCARSPSYICSGG TCVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:36) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 36	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT WVRQPPGKAMEWVAGISPMFGTPNYS DSVKGRFTISADGSSG TAYLQMNTLRAEDSAMY YCARSPSYICSGGTCVFDHWGQGTT VTVS (SEQ ID NO:37) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 37	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEVTFSSFALTWVRQPPG KAMEWVAGISPM MGHPNYS DSVKGRFTISADQSTR TAYLQMN TLRAEDSAMY YCARSPSYICMQMTCVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO: 3 8) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC(SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 38	Cadena 1: WVRQPPGKAMEWVAGISPM MGHPNYS DSVKGRFTI SADQSTR TAYLQMNTLRAEDSAMY YCARSPSYICSG GTCVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:39) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC(SEQ ID NO:24) EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT	Sí	No	No

(continuación)

S.NO.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SE UNE A		
		MPER DE HA	Glucanos sialilados	N-glucano proximal a MPER
Plegamiento interno 39	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT WVRQPPGKAMEWVAGISPMMGHPNYS DSVKGRFTI SADQSTR TAYLQMNTLRAEDSAMY YCARSPSYICM QMTCVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:40) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24)	Sí	No	No
Plegamiento interno 40	Cadena 1: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCASSEM TMGGSALT WVRQPPGKAMEWVAGISPMMGHPNYS DSVKGRFTI SADGSSGTAYLQMNTLRAEDSAMY YCARSPSYICM QMTCVFDHWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:41) Cadena 2: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24)	Sí	No	No

Los agentes de plegamiento interno como se reivindica se unen a la región MPER del polipéptido HA y se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 2, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 4, Plegamiento interno 5, Plegamiento interno 6, Plegamiento interno 7, Plegamiento interno 8, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 11, Plegamiento interno 12, Plegamiento interno 13, Plegamiento interno 14, Plegamiento interno 15, Plegamiento interno 16, Plegamiento interno 17, Plegamiento interno 18, Plegamiento interno 19, Plegamiento interno 20, Plegamiento interno 21, Plegamiento interno 22, Plegamiento interno 23, Plegamiento interno 24, Plegamiento interno 25, Plegamiento interno 26, Plegamiento interno 27, Plegamiento interno 28, Plegamiento interno 29, Plegamiento interno 30, Plegamiento interno 31, Plegamiento interno 32, Plegamiento interno 33, Plegamiento interno 34, Plegamiento interno 35, Plegamiento interno 36, Plegamiento interno 37, Plegamiento interno 38, Plegamiento interno 39 o Plegamiento interno 40. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 2, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 4, Plegamiento interno 5, Plegamiento interno 6, Plegamiento interno 7, Plegamiento interno 8, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 11, Plegamiento interno 12, Plegamiento interno 13, Plegamiento interno 14, Plegamiento interno 15, Plegamiento interno 16, Plegamiento interno 17, Plegamiento interno 18, Plegamiento interno 19, Plegamiento interno 20, Plegamiento interno 21 o Plegamiento interno 22. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 23, Plegamiento interno 24, Plegamiento interno 25, Plegamiento interno 26, Plegamiento interno 27, Plegamiento interno 28, Plegamiento interno 29, Plegamiento interno 30, Plegamiento interno 31, Plegamiento interno 32, Plegamiento interno 33, Plegamiento interno 34, Plegamiento interno 35, Plegamiento interno 36, Plegamiento interno 37, Plegamiento interno 38, Plegamiento interno 39 o Plegamiento interno 40.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y a glucanos, se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 11, Plegamiento interno 12, Plegamiento interno 14, Plegamiento interno 15, Plegamiento interno 17, Plegamiento interno 18 o Plegamiento interno 19. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y a glucanos, se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 11, Plegamiento interno 12, Plegamiento interno 14, Plegamiento interno

15, Plegamiento interno 17, Plegamiento interno 18, Plegamiento interno 19 o Plegamiento interno 22.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y a N-glucanos proximales a la MPER en el polipéptido HA, y se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 11, Plegamiento interno 12, Plegamiento interno 14, Plegamiento interno 15, Plegamiento interno 18 o Plegamiento interno 19.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y a glucanos sialilados en el receptor de HA, y se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 17 o Plegamiento interno 19. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA y a glucanos sialilados en el receptor de HA, y se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 17,1 Plegamiento interno 19 o Plegamiento interno 22.

En realizaciones adicionales, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA, los N-glucanos proximales a la MPER en el polipéptido HA y los glucanos sialilados en el receptor de HA y es Plegamiento interno 19.

Los agentes de plegamiento interno para su uso en conformidad con la presente invención incluyen cualquiera de los presentados en la Tabla 9. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 11, Plegamiento interno 12, Plegamiento interno 14, Plegamiento interno 15, Plegamiento interno 17, Plegamiento interno 18, Plegamiento interno 19, Plegamiento interno 22, Plegamiento interno 28 y Plegamiento interno 34. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se seleccionan del grupo que comprende el Plegamiento interno 1, Plegamiento interno 3, Plegamiento interno 9, Plegamiento interno 10, Plegamiento interno 17, Plegamiento interno 19 y Plegamiento interno 28.

La diana afín de los agentes de plegamiento interno en conformidad con la presente divulgación incluye al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA, en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 18, 19, 20, 21, 41, 45, 49, 52, 53 y 56, y combinaciones de los mismos. Los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto seleccionado del grupo que consiste en Trp21, Ile45, Asp19, Asn19, Ala19, His18, Gln18, Leu18, Ile18, Val18, Gly20, Thr41, Thr49, Asn49, Gln49, Val52, Leu52, Ile52, Asn53, Ile56 y Val56.

Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 18, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en His, Asp, Glu, Trp, Tyr, Asn, Lys, Arg, Gln, Met, Cys, Phe, Ile, Leu y Val, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 18 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 18, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en His, Asp, Glu, Trp, Tyr, Asn, Lys, Arg, Gln, Met, Cys, Phe, Ile, Leu, Val, Thr, Ser, Gly, Ala y Pro, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 18 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 18, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de His, Asp, Glu, Trp, Tyr, Asn, Lys, Arg, Gln, Met, Cys, Phe, Ile, Leu, Val, Thr, Ser, Gly, Ala o Pro, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.

Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 19, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, His, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Val, Ala y Gly, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 19 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 19, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, His, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Val, Ala, Gly, Tyr, Pro, Trp, Phe, Leu, Cys y Met, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 19 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 19, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Arg, Lys, His, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Val, Ala, Gly, Tyr, Pro, Trp, Phe, Leu, Cys o Met, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.

Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 20, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Gly, Ala, Cys, Met, Ser y Pro, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 20 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.

- 5 Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 20, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Gly, Ala, Asn, Asp, Arg, Phe, Trp, His, Tyr, Gln y Lys, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 20 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 20, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Gly, Ala, Cys, Met, Ser, Pro, Asn, Asp, Arg, Phe, Trp, His, Tyr, Gln o Lys, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.
- 10 Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 21, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Ile, Met, Phe, His, Cys y Pro, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 21 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 21, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Gly, Val, Arg, Ser, Thr, Trp, Leu y Ala, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 21 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 21, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Tyr, Ile, Met, Phe, His, Cys, Pro, Gly, Val, Arg, Ser, Thr, Trp, Leu o Ala, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.
- 25 Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 41, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Glu y Gln, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 41 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 41, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Met, Ile, Val, Tyr, Ala, Gly, His, Arg, Lys y Pro, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 41 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 41, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Met, Ile, Val, Tyr, Ala, Gly, His, Arg, Lys o Pro, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.
- 35 Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 45, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp y Cys, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 45 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 45, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Pro, Ala y Thr, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 45 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. En algunas realizaciones, cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 45, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp, Cys, Tyr, Pro, Ala o Thr, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.
- 50 Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 49, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys y Arg, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 45 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 49, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Met, Ile, Val, Tyr, Ala, Gly, His, Arg, Lys, Pro, Trp, Ser y Thr, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 49 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. En algunas realizaciones, cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 49, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Met, Ile, Val, Tyr, Ala, Gly, His, Pro o Trp, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.
- 65 Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 52, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, Ile, Phe, Met, Cys, Tyr y Trp, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 52 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio

de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 52, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Cys, Met, Trp, Tyr, Ala, Gly, Thr, Pro, His, Ser y Asp, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 52 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 52, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Val, Leu, Ile, Phe, Met, Cys, Tyr, Trp, Ala, Gly, Thr, Pro, His o Ser, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.

Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 53, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, Thr y Lys, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 53 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 53, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en His, Arg, Tyr, Gly, Ala, Trp y Pro, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 53 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 53, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, Thr, Lys, His, Arg, Tyr, Gly, Ala, Trp o Pro, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.

Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 56, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp y Cys, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 56 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 56, el agente de plegamiento interno puede estar dispuesto y construido de forma que contenga un resto de interacción seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Pro, Ala, Thr, Cys, Met, Trp y Gly, que se coloca con un radio de 4-7 Å del resto diana correspondiente a la posición 56 de la HA cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión. Cuando los restos diana afines incluyen al menos uno que corresponde a un resto encontrado en la HA en la posición 56, el agente de plegamiento interno no contiene un resto que no sea distinto de Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp, Cys, Tyr, Pro, Ala, Thr, Trp o Gly, cuando se coloca dentro de un radio de 4-7 Å cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión.

Como se analiza adicionalmente más adelante, un agente de plegamiento interno es un polipéptido que se une a un sitio de unión seleccionado. Como se describe en el presente documento, un agente de plegamiento interno tiene una estructura caracterizada por una cadena principal "plegada" poblada por restos de interacción seleccionados y dispuestos de manera que, cuando el agente de plegamiento interno está cerca del sitio de unión, los restos de interacción individuales se colocan dentro de una distancia o volumen preseleccionado de restos diana afines. Como se ha descrito, un agente de plegamiento interno es un polipéptido diseñado o técnicamente diseñado. Los agentes de plegamiento interno proporcionados en el presente documento se unen a un polipéptido de hemaglutinina (HA). Los agentes de plegamiento interno descritos se unen a un polipéptido HA en su región MPER. Los agentes de plegamiento interno descritos se unen a una región MPER de un polipéptido HA independientemente de su glucosilación. Por ejemplo, los agentes de plegamiento interno están diseñados para tener el tamaño apropiado para que su unión a una región MPER no esté impedida por su glucosilación. Un agente de plegamiento interno se puede unir a una región MPER glucosilada con una afinidad de al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más de su afinidad por una región MPER no glucosilada, por lo demás idéntica. Los agentes de plegamiento interno pueden tener tamaños volumétricos entre 6000-1,20,000 Å³. Los agentes de plegamiento interno proporcionados tienen un tamaño volumétrico que sea igual o menor que el tamaño volumétrico de un anticuerpo. Un agente de plegamiento interno puede tener un área de superficie de epítipo diana total de aproximadamente 20 x 30 = 600 Å². En algunas realizaciones, el área de superficie de epítipo diana total de un agente de plegamiento interno es inferior que aproximadamente 10 Å², 20 Å², 30 Å², 40 Å², 50 Å², 60 Å², 70 Å², 80 Å², 85 Å², 90 Å², 95 Å², 100 Å², 105 Å², 110 Å², 115 Å², 120 Å², 125 Å², 130 Å², 135 Å², 140 Å², 145 Å², 150 Å², 151 Å², 152 Å², 153 Å², 154 Å², 155 Å², 160 Å², 165 Å², 170 Å², 175 Å², 180 Å², 185 Å², 190 Å², 195 Å², 200 Å², 210 Å², 220 Å², 230 Å², 240 Å², 250 Å², 260 Å², 270 Å², 280 Å², 290 Å², 300 Å², 310 Å², 315 Å², 320 Å², 325 Å², 330 Å² o más grande. El área de superficie de epítipo diana total puede ser inferior a aproximadamente 200 Å², aproximadamente 175 Å², aproximadamente 150 Å², aproximadamente 125 Å² o más pequeña.

Los agentes de plegamiento interno reivindicados tienen una longitud que es inferior a aproximadamente 1000 aminoácidos. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno tienen una longitud que es menor que una longitud máxima de aproximadamente 1000, 975, 950, 925, 900, 875, 850, 825, 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno tienen una longitud que es mayor que una longitud mínima de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno tienen una longitud entre una cualquiera de tales longitudes mínimas y una cualquiera de tales longitudes máximas, siempre que la longitud máxima sea mayor que la longitud mínima. En algunas realizaciones particulares, un agente de plegamiento interno tiene una longitud de entre aproximadamente 20 y 500, o de entre 30 y 400, o de entre 40 y 300, o de entre 80 y 250 aminoácidos. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno tiene una longitud de aproximadamente 84, 88, 93, 95, 98, 104, 106, 110, 111, 116, 119, 123, 124, 132, 212, 215, 244 o 245. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno están compuestos por aminoácidos naturales. En otras realizaciones, los agentes de plegamiento interno están compuestos por aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno están compuestos por combinaciones de aminoácidos naturales y no naturales. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno está compuesto por una, dos o más cadenas polipeptídicas que estén covalentemente (por ejemplo, mediante un enlazador) o no covalentemente asociadas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno puede estar unido a, o ser parte de, una cadena polipeptídica más larga (por ejemplo, un anticuerpo completo, albúmina sérica u otra proteína transportadora) siempre que el agente de plegamiento interno conserve su estructura tridimensional y su disposición para la interacción. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno pueden agregarse a los extremos N o C de otra secuencia polipeptídica que es o no es un plegamiento interno. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se incorporan en la secuencia de otro polipéptido que es o no es un plegamiento interno, separando de este modo la secuencia polipeptídica en dos o más segmentos. En algunas realizaciones, agregar el plegamiento a los extremos N o C o dentro de la secuencia de otro polipéptido que es o no un plegamiento puede permitir al menos uno o más de los siguientes: una disminución de la inmunogenicidad, una vida útil en la circulación aumentada, una degradación más lenta *in vivo*, el estímulo de una respuesta inmunitaria local, la interacción con las moléculas del sistema inmunitario, un aumento en el volumen, un aumento en la afinidad por la diana (o dianas) de plegamiento interno, un aumento en la especificidad por la diana (o dianas) de plegamiento interno o el uso de otros protocolos de administración terapéutica/preventiva comúnmente utilizados. En algunas realizaciones, agregar un plegamiento a los extremos N o C o dentro de la secuencia de otro polipéptido que es o no un plegamiento no tiene un efecto directo sobre la unión de un agente de plegamiento a una diana (por ejemplo, un polipéptido HA, la región MPER de un polipéptido HA, N-glucanos en un polipéptido HA, receptores de HA o glucanos sialilados en los receptores de HA).

Los agentes de plegamiento interno pueden unirse a sus sitios de unión diana mediante la interacción con uno o más restos diana. En algunas realizaciones, tales restos diana son aminoácidos, sacáridos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones la presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que se unen a un polipéptido HA, a glucanos unidos en N en un polipéptido HA, a un receptor de HA, a glucanos sialilados en un receptor de HA o diversas combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes polipeptídicos que comprenden un primer agente de plegamiento interno que se une a un polipéptido HA y un segundo agente de plegamiento interno que se une al receptor de HA. En algunas de tales realizaciones, el agente polipeptídico comprende una única cadena polipeptídica que comprende el primer y el segundo plegamiento interno, opcionalmente conectados entre sí por medio de uno o más aminoácidos enlazadores. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno que se une a un receptor de HA interactúa con uno o más glucanos en el receptor de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos sialilados. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a los glucanos sialilados que tienen una topología de tipo paraguas. En determinadas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos con topología de paraguas con alta afinidad y/o especificidad. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno muestran una preferencia de unión para los glucanos con topología de paraguas en comparación con los glucanos con otras topologías (por ejemplo, glucanos con topología de cono). En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a glucanos en los receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno compiten con la HA para unirse a un glucano con topología de paraguas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno proporcionado en el presente documento es un agente de bloqueo con topología de paraguas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno proporcionado en el presente documento es un agente de bloqueo específico con topología de paraguas. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno tiene una estructura de cadena principal plegada poblada por una pluralidad de restos de aminoácido de unión directa (es decir, restos de aminoácido que hacen contactos directos con aminoácidos o glucanos de la HA), y/o con aminoácidos o glucanos del receptor de HA como se describe en el presente documento.

Actividades del agente de plegamiento interno

Como se analiza en el presente documento, la presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que se unen a polipéptidos HA y/o a receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados se unen a polipéptidos HA independientemente del subtipo. En algunas realizaciones, se proporcionan agentes de plegamiento interno que logran la neutralización universal de la gripe a través de la unión al polipéptido HA.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA del subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. En concreto, en algunas realizaciones, los agentes de

plegamiento interno se unen a polipéptidos HA que tienen elementos de secuencia característicos de uno o más de los polipéptidos HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno se une a uno o más de polipéptidos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 con una afinidad de al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90% o más de su afinidad por uno o más de un polipéptido HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 distinto. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno muestra afinidades de unión para distintos polipéptidos HA (por ejemplo, polipéptidos HA de distintos grupos, clados o clústeres, y/o de distintas cepas) que están dentro de 5 veces la afinidad de unión entre sí. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno muestra afinidades de unión para distintos polipéptidos HA que están dentro de 2 veces la de entre sí (véase, por ejemplo, la Figura 7). En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno muestra afinidades de unión para distintos polipéptidos HA (por ejemplo, polipéptidos HA de distintos grupos, clados o clústeres, y/o de distintas cepas) que están dentro de 150 veces (por ejemplo, dentro de 100 veces, dentro de 50 veces, dentro de 25 veces, dentro de 10 veces o dentro de 5 veces) la afinidad de unión entre sí.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados se unen a al menos dos polipéptidos HA H1, H3, H5, H7 y/o H9. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados se unen a al menos tres, cuatro o cinco de los polipéptidos HA H1, H3, H5, H7 y/o H9.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados se unen a polipéptidos HA de al menos uno de los subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16, y no se unen a al menos un polipéptido HA de los subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA del subtipo H1. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA del subtipo H1 con una afinidad de al menos el 100 %, al menos el 125 %, al menos el 150 %, al menos el 200% o más de la con que se unen a polipéptidos HA de al menos un subtipo de H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA del subtipo H3. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA del subtipo H3 con una afinidad de al menos el 100 %, al menos el 125 %, al menos el 150 %, al menos el 200% o más de la con que se unen a polipéptidos HA de al menos un subtipo de H1, H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a un sitio de unión que incluye regiones de los dominios HA-1 y HA-2 en un polipéptido HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a regiones de un dominio HA-1. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a regiones de un dominio HA-2. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a ambas regiones del dominio HA-1 y el dominio HA-2. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER de un polipéptido HA.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a una región MPER glucosilada. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a regiones MPER no glucosiladas. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a la región MPER del polipéptido HA, independiente de los niveles de glucosilación de la MPER. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA independientemente de los niveles de glucosilación con alta afinidad y/o especificidad. En algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno se une a una región MPER glucosilada con una afinidad de al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más de su afinidad por una región MPER no glucosilada, por lo demás idéntica.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen al polipéptido HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos unidos en N en el polipéptido HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a N-glucanos proximales a la MPER en el polipéptido HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a los glucanos unidos a N en la región proximal a MPER de polipéptidos HA con alta afinidad y/o especificidad.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a receptores de HA. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA y a receptores de HA. En algunas de tales realizaciones, uno o más agentes de plegamiento interno proporcionados pueden unirse simultáneamente a polipéptidos HA y a receptores de HA. Entre otras cosas, la presente invención abarca el reconocimiento de que el uso de agentes de plegamiento interno que se unen tanto a los polipéptidos HA como a los receptores de HA puede permitir la inhibición eficaz de la infección por virus de la gripe con cantidades más bajas de agente terapéutico (es decir, agente de plegamiento interno) de lo que se precisaría para un agente que se une solo al polipéptido HA o al receptor de HA, pero no ambos. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, los inventores proponen que la capacidad de unir ambos lados de la interacción polipéptido HA-receptor de HA permite una concentración local aumentada de inhibidor (es decir, de agente de plegamiento interno) solo en los sitios que son de interés; el agente de plegamiento interno no se "desperdicia" en polipéptidos o receptores de HA que no participan en la infección.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a receptores de HA sialilados. En algunas

realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos sialilados en $\alpha 2,6$; en algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen preferentemente a glucanos sialilados en $\alpha 2,6$. En determinadas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a una pluralidad de glucanos sialilados en $\alpha 2,6$ distintos. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno no pueden unirse a los glucanos sialilados en $\alpha 2,3$ y en algunas realizaciones los agentes de plegamiento interno pueden unirse a glucanos sialilados en $\alpha 2,3$.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos sialilados que tienen una topología de tipo paraguas. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos con topología de paraguas (y/o a miméticos de glucanos con topología de paraguas) más fuertemente de lo que se unen a los glucanos con topología de cono. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno muestran una afinidad relativa por los glucanos de paraguas frente a los glucanos de cono que es aproximadamente de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a los glucanos con topología de paraguas (por ejemplo, glucanos sialilados en $\alpha 2,6$ largos tales como, por ejemplo, Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc), con alta afinidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos con topología de paraguas con una afinidad comparable a la observada para un polipéptido HA de tipo silvestre que actúa como mediador en la infección de un ser humano (por ejemplo, polipéptido HA H1N1 o polipéptido HA H3N2). En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a los glucanos de paraguas con una afinidad que es al menos del 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de lo observado en condiciones comparables para un polipéptido HA de tipo silvestre que actúa como mediador en la infección de seres humanos. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos de paraguas con una afinidad que es mayor que la observada en condiciones comparables para un polipéptido HA de tipo silvestre que actúa como mediador en la infección de seres humanos.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a uno o más de los glucanos ilustrados en la Figura 12. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a múltiples glucanos ilustrados en la Figura 12. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen con alta afinidad y/o especificidad a los glucanos ilustrados en la Figura 12. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen preferentemente a los glucanos ilustrados en la Figura 12 en comparación con su unión a los glucanos ilustrados en la Figura 11. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a un oligosacárido de la siguiente forma:

Neu5Ac $\alpha 2,6$ Sug1-Sug2-Sug3
en que:

1. Neu5Ac $\alpha 2,6$ está siempre o casi siempre en el extremo no reductor;
2. Sug1:

- a. es una hexosa (frecuentemente Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β - para la extensión unida en N y O y α - en el caso de GalNAc α - que está unida en O a la glicoproteína);
- b. no debería haber azúcares distintos de Neu5Ac $\alpha 2,6$ unidos a ninguna de las posiciones no reductoras de Sug1 (excepto cuando Sug1 es GalNAc α -, que está unido en O a la glucoproteína); y/o
- c. las fracciones no azúcar tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc. pueden estar unidas a posiciones no reductoras (normalmente, la posición 6) de Sug1 para mejorar los contactos con la HA;

3. Sug2 y/o Sug3:

- a. una hexosa (frecuentemente Gal o Glc) o hexosamina (GlcNAc o GalNAc) en configuración α o β (frecuentemente β); y/o
- b. las fracciones de azúcares (tales como Fuc) o no azúcar tales como sulfato, fosfato, guanidinio, amina, N-acetilo, etc. pueden estar unidas a posiciones no reductoras de Sug2, Sug3 y/o Sug4;

4. El enlace entre dos azúcares cualesquiera en el oligosacárido aparte del enlace Neu5Ac $\alpha 2,6$ puede ser 1-2, 1-3, 1-4 y/o 1-6 (normalmente, 1-3 o 1-4); y/o

5. La estructura en que Neu5Ac $\alpha 2,6$ está unido GalNAc α que está unido en O a la glucoproteína y los azúcares adicionales están unidos al extremo no reductor de GalNAc α , por ejemplo

- i. Neu5Ac $\alpha 2,6$ (Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1-3$)GalNAc α -
- ii. Neu5Ac $\alpha 2,6$ (Gal $\beta 1-3$)GalNAc α -

En determinadas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a glucanos con topología de paraguas con alta afinidad y/o especificidad. La presente invención abarca el reconocimiento de que adquirir la capacidad de unirse a glucanos con topología de paraguas (por ejemplo, glucanos sialilados en $\alpha 2,6$ largos), y particularmente una capacidad para unirse con alta afinidad, puede conferir a un agente de plegamiento interno la capacidad de proporcionar neutralización de amplio espectro dirigida contra el virus de la gripe. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, los inventores proponen que la unión a los glucanos con topología de paraguas puede ser

primordial, y en particular que la pérdida de unión a otros tipos de glucanos puede no ser necesaria.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que se unen a glucanos con topología de paraguas que se encuentran en los receptores de HA de una especie diana particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes de plegamiento interno que se unen a glucanos con topología de paraguas que se encuentran en los receptores de HA humanos, por ejemplo, los receptores de HA encontrados en las células epiteliales humanas, y particularmente los agentes de plegamiento interno que se unen a los glucanos con topología de paraguas encontrados en los receptores de HA humanos en las vías respiratorias altas.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a los receptores que se encuentran en las células epiteliales de las vías respiratorias altas humanas. En determinadas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen a receptores de HA en el bronquio y/o la tráquea. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno no pueden unirse a receptores en áreas distales del pulmón, y en algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno pueden unirse a receptores en áreas distales del pulmón.

En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno se unen al menos aproximadamente al 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de los glucanos encontrados en los receptores de HA en los tejidos de las vías respiratorias altas humanas (por ejemplo, células epiteliales).

En determinadas realizaciones, la afinidad de unión de los agentes de plegamiento interno se evalúa en un intervalo de concentraciones. Una estrategia de este tipo proporciona significativamente más información, en particular en ensayos de unión multivalentes, que los análisis de concentración única. En algunas realizaciones, por ejemplo, las afinidades de unión de los agentes de plegamiento interno se evalúan a través de concentraciones que varían al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces.

Producción de agentes de plegamiento interno

Los agentes de plegamiento interno y/o las partes características de los mismos, los o ácidos nucleicos que los codifican, pueden producirse mediante cualquier medio disponible.

Se pueden producir agentes de plegamiento interno (o partes características), por ejemplo, mediante la utilización de un sistema de células hospedadoras técnicamente diseñado para expresar un ácido nucleico codificante de polipéptido de la invención. Como alternativa o adicionalmente, los agentes de plegamiento interno pueden prepararse parcial o totalmente mediante síntesis química.

Cuando los agentes de plegamiento interno se expresan en células (por ejemplo, células técnicamente diseñadas), para producir los agentes de plegamiento interno (o porciones características de los mismos) puede utilizarse cualquier sistema de expresión. Por proporcionar unos pocos ejemplos, los sistemas de expresión conocidos incluyen, por ejemplo, huevo, baculovirus, células vegetales, levaduras, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) o células Vero (de riñón de mono verde africano). Como alternativa o adicionalmente, los agentes de plegamiento interno (o partes características) pueden expresarse en células utilizando técnicas recombinantes, tal como a través del uso de un vector de expresión (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual", CSHL Press, 1989).

Como alternativa o adicionalmente, los agentes de plegamiento interno (o partes características de los mismos), puede producirse en el contexto de virus intactos, ya sea de tipo silvestre, atenuados, muertos, etc. Los agentes de plegamiento interno, o partes características de los mismos, también pueden producirse en el contexto de partículas similitivas.

Además, los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos, y en particular los agentes de plegamiento interno, como se describe en el presente documento, pueden generarse, identificarse, aislarse y/o producirse mediante el cultivo de células u organismos que produzcan agentes de plegamiento interno (ya sea solos o como parte de un complejo, incluso como parte de una partícula de virus o virus), en condiciones que permitan el cribado y/o la selección de polipéptidos capaces de unirse a glucanos con topología de paraguas. Por proporcionar un solo ejemplo, en algunas realizaciones, puede ser útil producir y/o estudiar una colección de agentes de plegamiento interno en condiciones que revelen y/o favorezcan las variantes que se unen a polipéptidos HA o glucanos con topología de paraguas (por ejemplo, con especificidad y/o afinidad particulares). En algunas realizaciones, tal colección de agentes de plegamiento interno es el resultado de la evolución en la naturaleza. En algunas realizaciones, tal colección de agentes de plegamiento interno es el resultado del diseño técnico. En algunas realizaciones, tal colección de agentes de plegamiento interno es el resultado de una combinación de diseño técnico y evolución natural.

Ácidos nucleicos

La presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un agente de plegamiento interno o una parte característica o biológicamente activa de un agente de plegamiento interno. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácidos nucleicos que son complementarios a ácidos nucleicos que codifican un agente de plegamiento

interno o una parte característica o biológicamente activa de un agente de plegamiento interno.

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico que hibridan con ácidos nucleicos que codifican un agente de plegamiento interno o una parte característica o biológicamente activa de un agente de plegamiento interno. Dichos ácidos nucleicos pueden utilizarse, por ejemplo, como cebadores o como sondas. Por proporcionar unos pocos ejemplos, tales ácidos nucleicos pueden utilizarse como cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como sondas para hibridación (incluyendo hibridación *in situ*) y/o como cebadores para transcripción inversa-PCR (RT-PCR).

Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más nucleótidos no naturales; los ácidos nucleicos incluyen solo nucleótidos naturales.

Anticuerpos para agentes de plegamiento interno

La presente invención proporciona anticuerpos para agentes de plegamiento interno. Estos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden prepararse mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse mediante técnicas de cultivo celular, incluida la generación de anticuerpos monoclonales, o mediante la transfección de genes de anticuerpos en hospedadores celulares bacterianos o de mamífero adecuados, para permitir la producción de anticuerpos recombinantes.

Sistemas para identificar y/o caracterizar agentes de plegamiento interno

La presente invención proporciona una diversidad de sistemas para analizar, caracterizar y/o identificar agentes de plegamiento interno.

Los agentes de plegamiento interno pueden caracterizarse mediante tales sistemas y métodos que implican poner en contacto el agente de plegamiento interno con uno o más sustratos candidatos, tales como regiones de polipéptidos HA, la región MPER de polipéptidos HA, N-glucanos en polipéptidos HA, receptores de HA, receptores de HA sialilados, glucanos en receptores de HA sialilados y/o glucanos con topología de paraguas en receptores de HA sialilados.

Un agente de plegamiento interno y/o el sustrato candidato pueden estar en solución, fijados a un soporte y/o expresarse en y/o sobre la superficie de una célula. El sustrato candidato y/o el agente de plegamiento interno pueden estar marcados, permitiendo de este modo la detección de la unión. La especie marcada es o bien el agente de plegamiento interno o bien el sustrato candidato. Se pueden realizar formatos de unión competitiva en los que una de las sustancias está marcada, y se puede medir la cantidad de marcador libre frente al marcador unido para determinar el efecto sobre la unión.

Los ensayos de unión pueden implicar, por ejemplo, exponer un sustrato candidato a un agente de plegamiento interno y detectar la unión entre el sustrato candidato y el agente de plegamiento interno. Se puede realizar un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, en un tubo candidato, que comprenda sustancialmente solo los componentes mencionados; en extractos sin células; y/o en componentes sustancialmente purificados). Como alternativa o adicionalmente, se pueden realizar ensayos de unión en células y/o *in vivo* (por ejemplo, dentro de una célula, tejido, órgano y/u organismo; descrito con más detalle a continuación).

Se pone en contacto al menos un agente de plegamiento interno con al menos un sustrato candidato y se detecta un efecto. Por ejemplo, un agente de plegamiento interno se pone en contacto con un sustrato candidato, y se controla la unión entre las dos entidades. Un ensayo puede implicar poner en contacto un sustrato candidato con una porta característica de un agente de plegamiento interno. Se detecta la unión del agente de plegamiento interno al sustrato candidato. Se apreciará que pueden emplearse fragmentos, partes, homólogos, variantes y/o derivados de agentes de plegamiento interno, siempre que comprendan la capacidad de unirse a uno o más sustratos candidatos.

La unión de un agente de plegamiento interno al sustrato candidato puede determinarse mediante una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. La presente invención proporciona ensayos que implican agentes de plegamiento interno unidos en fase sólida y la detección de sus interacciones con uno o más sustratos candidatos. Por lo tanto, un agente de plegamiento interno puede comprender un marcador detectable, tal como un marcador radiactivo, fluorescente y/o luminiscente. Adicionalmente, el sustrato candidato se puede acoplar a sustancias que permitan la detección indirecta (por ejemplo, mediante el empleo de una enzima que usa un sustrato cromogénico y/o mediante la unión de un anticuerpo detectable). Pueden detectarse cambios en la conformación de los agentes de plegamiento interno como resultado de una interacción con un sustrato candidato, por ejemplo, mediante el cambio en la emisión del marcador detectable. Como alternativa o adicionalmente, se pueden analizar mediante espectrometría de masas complejos de proteínas unidos a fase sólida.

El agente de plegamiento interno puede no estar inmovilizado. El componente no inmovilizado puede estar marcado (con, por ejemplo, un marcador radioactivo, una etiqueta epitópica, un conjugado de enzima-anticuerpo, *etc.*). Como

alternativa o adicionalmente, la unión se puede determinar mediante técnicas de detección inmunológicas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede someterse a transferencia de Western y la transferencia sondarse con un anticuerpo que detecte el componente no inmovilizado. Como alternativa o adicionalmente, para someter a ensayo la unión puede utilizarse el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, forma siglada de *enzyme linked immunosorbent assay*).

Las células se pueden someter a ensayo directamente en cuanto a la unión entre los agentes de plegamiento interno y los sustratos candidatos. Las técnicas inmunohistoquímicas, las técnicas confocales y/u otras técnicas para evaluar la unión son bien conocidas por los expertos en la materia. Se pueden utilizar diversas líneas celulares para tales ensayos de cribado, que incluyen células técnicamente diseñadas de forma específica para este fin. Los ejemplos de células utilizadas en los ensayos de cribado incluyen células de mamífero, células fúngicas, células bacterianas o células víricas. Una célula puede ser una célula estimulada, tal como una célula estimulada con un factor de crecimiento. Un experto en la materia entenderá que la invención divulgada en el presente documento contempla una amplia diversidad de ensayos en células para medir la capacidad de los agentes de plegamiento interno para unirse a sustratos candidatos.

Dependiendo del ensayo, puede ser necesario un cultivo celular y/o tisular. Una célula puede examinarse utilizando cualquiera de varios ensayos fisiológicos distintos. Como alternativa o adicionalmente, se puede realizar un análisis molecular, incluyendo, pero sin limitación, transferencia de Western para controlar la expresión de proteínas y/o probar las interacciones proteína-proteína; espectrometría de masas para controlar otras modificaciones químicas; etc.

La presente invención proporciona métodos de identificación de agentes de plegamiento interno que se unen a sustratos candidatos y, por lo tanto, que puede estar implicados en la infección gripal. Un método en células de identificación de sustancias que se unen a sustratos candidatos es el ensayo del sistema de dos híbridos (Fields *et al.*, 1994, Trends in Genetics, 10:286; y Colas *et al.*, 1998, TIBTECH, 16:355). En este ensayo, las células de levadura expresan una primera proteína de fusión que comprende una sustancia de prueba en conformidad con la presente invención (por ejemplo, un agente de plegamiento interno, un gen que codifica un agente de plegamiento interno y/o partes características del mismo) y un dominio de unión a ADN de un factor de transcripción tal como Gal4 y/o LexA. Las células contienen adicionalmente un gen indicador cuyo promotor contiene sitios de unión para el dominio de unión a ADN correspondiente. Al transformar las células con un vector que expresa una segunda proteína de fusión que consiste en un sustrato candidato fusionado a un dominio de activación (por ejemplo, de Gal4 y/o del virus del herpes simple VP16), la expresión del gen indicador puede verse enormemente aumentada si el sustrato candidato interactúa con el agente de plegamiento interno. De esta manera, es posible identificar rápidamente nuevos agentes de plegamiento interno.

Cualquiera de los ensayos de unión descritos en el presente documento puede realizarse utilizando un intervalo de concentraciones de agentes de plegamiento interno y/o de sustratos candidatos. Los ensayos de unión descritos en el presente documento se utilizan para evaluar la capacidad de un sustrato candidato para unirse a un agente de plegamiento interno por encima de un intervalo de concentraciones del agente de plegamiento interno (por ejemplo, mayor que aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 1,75 µg/ml, aproximadamente 1,5 µg/ml, aproximadamente 1,25 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml, aproximadamente 0,9 µg/ml, aproximadamente 0,8 µg/ml, aproximadamente 0,7 µg/ml, aproximadamente 0,6 µg/ml, aproximadamente 0,5 µg/ml, aproximadamente 0,4 µg/ml, aproximadamente 0,3 µg/ml, aproximadamente 0,2 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml, aproximadamente 0,05 µg/ml, aproximadamente 0,01 µg/ml y/o menos de aproximadamente 0,01 µg/ml).

Cualquiera de los estudios de unión descritos en el presente documento puede ejecutarse en una manera de alto rendimiento. Utilizando ensayos de alto rendimiento, es posible cribar hasta varios miles de agentes de plegamiento interno en un solo día. En algunas realizaciones, se puede utilizar cada pocillo de una placa de microtitulación para ejecutar un ensayo separado contra un sustrato candidato seleccionado o, si se van a observar los efectos de la concentración y/o del tiempo de incubación, cada 5 a 10 pocillos pueden probar un solo sustrato candidato. Por lo tanto, una única placa de microtitulación convencional puede someter a ensayo hasta 96 interacciones de unión entre agentes de plegamiento interno y sustratos candidatos; si se utilizan placas de 1536 pocillos, entonces una única placa puede someter a ensayo hasta 1536 interacciones de unión entre agentes de plegamiento interno y sustratos candidatos; y así sucesivamente. Es posible someter a ensayo muchas placas por día. Por ejemplo, se pueden realizar hasta aproximadamente 6.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 50.000 o más de aproximadamente 100.000 cribados de ensayo sobre interacciones de unión entre agentes de plegamiento interno y sustratos candidatos, utilizando sistemas de alto rendimiento en conformidad con la presente invención.

Dichos métodos utilizan un hospedador animal. Como se usa en el presente documento, un "hospedador animal" incluye cualquier modelo animal adecuado para la investigación de la gripe. Por ejemplo, los hospedadores animales adecuados para la invención pueden ser hospedadores mamíferos, incluyendo primates, hurones, gatos, perros, vacas, caballos, roedores tales como ratones, hámsteres, conejos y ratas. En determinadas realizaciones, un hospedador animal utilizado para la invención es un hurón. En particular, en algunas realizaciones, un hospedador

animal no se ha expuesto previamente a la exposición o infección vírica antes de la administración de un agente de plegamiento interno (opcionalmente en una composición de la invención). En algunas realizaciones, el hospedador animal se inocula con, se infecta con o se expone de otra manera al virus antes o de forma simultánea con la administración de un agente de plegamiento interno. Un hospedador animal utilizado en la práctica de la presente invención puede inocularse con, infectarse con o exponerse de otra manera al virus mediante cualquier método conocido en la técnica. Un hospedador animal puede inocularse con, infectarse con o exponerse al virus por vía intranasal.

Un hospedador animal adecuado puede tener una distribución de glucanos con topología de paraguas frente a los de topología de cono, y/o glucanos $\alpha 2,6$ frente a glucanos $\alpha 2,3$, similar a la distribución encontrada en el tracto respiratorio humano. Por ejemplo, se contempla que un hurón como hospedador animal puede ser más representativo que un ratón cuando se utiliza como modelo de enfermedad provocada por virus de la gripe en humanos (Tumpey, et al. Science (2007) 315; 655-659). Sin desear quedar ligados a ninguna teoría, la presente invención abarca la idea de que los hurones pueden tener una distribución más similar de glucanos en el tracto respiratorio a los del tracto respiratorio humano que el ratón.

Los animales sin exposición previa y/o inoculados pueden utilizarse para cualquiera de una variedad de estudios. Por ejemplo, tales modelos animales pueden utilizarse para estudios de transmisión de virus como se conoce en la técnica. Se contempla que el uso de hurones en estudios de transmisión de virus puede servir como un factor pronóstico fiable para la transmisión de virus en seres humanos. Por ejemplo, la transmisión aérea de la gripe vírica de animales inoculados (por ejemplo, hurones) a animales sin exposición previa se conoce en la técnica (Tumpey, et al. Science (2007) 315; 655-659). Los estudios de transmisión de virus pueden utilizarse para probar agentes de plegamiento interno. Por ejemplo, los agentes de plegamiento interno pueden administrarse a un hospedador animal adecuado antes, durante o después de los estudios de transmisión del virus para determinar la eficacia de dicho agente de plegamiento interno en el bloqueo de la unión y/o la infectividad del virus en el hospedador animal. Utilizando la información recopilada de los estudios de transmisión de virus en un hospedador animal, se puede predecir la eficacia de un agente de plegamiento interno en el bloqueo de la unión y/o la infectividad del virus en un hospedador humano.

Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen agentes de plegamiento interno y/o entidades relacionadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, están incluidos en las composiciones farmacéuticas agentes de plegamiento interno, ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, fragmentos característicos o biológicamente activos de tales polipéptidos o ácidos nucleicos, anticuerpos que se unen y/o compiten con tales polipéptidos o fragmentos, moléculas pequeñas que interactúan o compiten con tales polipéptidos o con glucanos que se unen a ellos, etc.

La invención abarca el tratamiento de la infección gripal mediante la administración de tales composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto que padece o es susceptible a una infección gripal. En algunas realizaciones, se considera que un sujeto padece una infección gripal en un sujeto que presenta uno o más síntomas comúnmente asociados con la infección gripal. En algunas realizaciones, se sabe o se cree que el sujeto estuvo expuesto al virus de la gripe. En algunas realizaciones, se considera que un sujeto es susceptible a una infección gripal si se sabe o se cree que el sujeto ha estado expuesto al virus de la gripe. En algunas realizaciones, se sabe o se cree que un sujeto ha estado expuesto al virus de la gripe si el sujeto ha estado en contacto con otros individuos que se sabe o se sospecha que se han infectado con el virus de la gripe y/o si el sujeto está o ha estado presente en un lugar en que se sabe o se cree que la infección gripal es prevalente.

En algunas realizaciones, los sujetos que padecen o son susceptibles a la infección gripal se analizan en cuanto a anticuerpos para agentes de plegamiento interno antes de, durante o después de la administración de composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, a los sujetos que tienen tales anticuerpos no se les administran composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de plegamiento interno. En algunas realizaciones, se selecciona una dosis apropiada de composición farmacéutica y/o de agente de plegamiento interno basándose en la detección (o falta de la misma) de tales anticuerpos.

En algunas realizaciones, se hace constar la selección de un sujeto particular para el tratamiento, un agente de plegamiento interno o una composición para la administración particular, y/o una dosis o régimen para la administración particular, por ejemplo, en una forma escrita, impresa o de almacenamiento electrónico.

Las composiciones de la invención se pueden administrar antes o después del desarrollo de uno o más síntomas de infección gripal.

La invención abarca el tratamiento de las infecciones gripales mediante la administración de agentes descritos en el presente documento.

La presente invención también proporciona otras composiciones terapéuticas útiles en el tratamiento de infecciones

víricas. En algunas realizaciones, el tratamiento se realiza mediante la administración de un agente que interfiere con la expresión o la actividad de un polipéptido HA.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos u otros agentes relacionados con los agentes de plegamiento interno proporcionados. Por ejemplo, la invención proporciona composiciones que contienen anticuerpos que reconocen agentes de plegamiento interno, ácidos nucleicos (tales como secuencias de ácido nucleico complementarias a secuencias de agentes de plegamiento interno que puede utilizarse para ARNi) o combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se utilizan colecciones de distintos agentes que tienen diversas estructuras. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas comprenden uno o más agentes multivalentes. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración urgente poco después de la exposición o sospecha de exposición al virus de la gripe.

En general, una composición farmacéutica incluirá un agente terapéutico además de uno o más agentes inactivos tales como un vehículo estéril biocompatible incluyendo, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, solución salina tamponada o solución de dextrosa. Como alternativa o adicionalmente, la composición puede contener cualquiera de una diversidad de aditivos, tales como estabilizantes, tampones, excipientes (por ejemplo, azúcares, aminoácidos, etc.) o conservantes.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico presente en una composición farmacéutica de la invención consistirá en uno o más agentes de plegamiento interno como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención contiene un agente de plegamiento interno que se une a polipéptidos HA o a glucanos con topología de paraguas (y/o a miméticos de glucanos con topología de paraguas). En algunas de tales realizaciones, la composición de la invención está sustancialmente exenta de agentes relacionados (por ejemplo, de otros agentes de plegamiento interno, etc.) que no se unen a glucanos con topología de paraguas. En algunas de tales realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen no más de al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más de un agente que se une a un polipéptido HA glucosilado o no glicosilado, y/o glucanos de receptores de HA distintos de glucanos con topología de paraguas.

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

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada incluirá un agente de plegamiento interno que no está agregado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 % o 30 %, en peso seco o número, de agentes de plegamiento interno, está presente en un agregado.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada incluirá un agente de plegamiento interno que no está desnaturalizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 % o 30 %, en peso seco o número, de los agentes de plegamiento interno administrados está desnaturalizado.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada incluirá un agente de plegamiento interno que no está inactivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 % o 30 %, en peso seco o número, de los agentes de plegamiento interno administrados está inactivo.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para reducir la inmunogenicidad de los agentes de plegamiento interno proporcionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente de plegamiento interno proporcionado está asociado con (por ejemplo, unido a) un agente, tal como polietilenglicol y/o carboximetilcelulosa, que enmascara su inmunogenicidad. En algunas realizaciones, un agente de unión proporcionado tiene glucosilación adicional que reduce la inmunogenicidad.

Terapia de combinación

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos que incluyen, pero sin limitación, vacunas y/o anticuerpos. Por "en combinación con" no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo o formularse para la administración conjunta, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la invención. En general, cada agente se administrará a una dosis y con un cronograma determinado para ese agente. Adicionalmente, la invención abarca la administración de las composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir o modificar su metabolismo, inhibir su excreción o modificar su distribución dentro del organismo. Aunque las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de cualquier sujeto (por ejemplo, cualquier animal) que lo necesite, se utilizan muy preferentemente en el tratamiento de seres humanos.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o los agentes de plegamiento interno pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes. En algunas realizaciones, las

composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o los agentes de plegamiento interno pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes de plegamiento interno. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o uno o más agentes de plegamiento interno pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes de farmacéuticos (por ejemplo, vacuna contra la gripe, agente antivírico, analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, agentes esteroideos, anticuerpos, sialidasa, etc.). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o los agentes de plegamiento interno pueden administrarse en combinación con un adyuvante.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o uno o más agentes de plegamiento interno se administran en combinación con uno o más anticuerpos. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a polipéptidos HA en el virus. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a la región MPER del polipéptido HA (por ejemplo, los polipéptidos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16). En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a una región MPER glucosilada del polipéptido HA. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen al receptor de HA. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a glucanos sialilados en el receptor de HA. En algunas realizaciones, los anticuerpos son C179, F10 y CR6261.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o uno o más agentes de plegamiento interno se administran en combinación con uno o más agentes antivíricos. En algunas realizaciones, tales agentes antivíricos incluyen, pero sin limitación, aciclovir, ribavirina, amantadina, remantidina, zanamivir (Relenza), oseltamivir (Tamiflu), amantadina, rimantadina y/o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención y/o uno o más agentes de plegamiento interno se administran en combinación con una o más vacunas. En algunas realizaciones, la vacuna es una vacuna antivírica. En algunas realizaciones, la vacuna es una vacuna contra la gripe. En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe es para tratar la gripe estacional (por ejemplo, comúnmente denominada gripe). En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe es la vacuna antigripal y/o FluMist. En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe está dirigida a una combinación específica de uno o más polipéptidos HA (por ejemplo, los polipéptidos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16). En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe es específica para una o más combinaciones de virus of H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 o H10N7. En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe es específica para virus H1N1. En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe es específica para virus H3N2. En algunas realizaciones, la vacuna contra la gripe es específica para virus H1N1 y H3N2.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y/o uno o más agentes de plegamiento interno pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticos utilizados para tratar los síntomas asociados con la infección por el virus de la gripe A. En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos utilizados para tratar los síntomas asociados con la infección gripal son analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos utilizados para tratar los síntomas asociados con la infección gripal son acetaminofeno, ibuprofeno, aspirina, naproxeno y/o combinaciones de los mismos.

Métodos de administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse mediante una diversidad de vías, incluyendo la oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, subcutánea, intraventricular, transdérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, cremas o gotas), mucosa, nasal, bucal, entérica, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; y/o como una pulverización oral, pulverización nasal y/o un aerosol. En general, la vía de administración más apropiada dependerá de una diversidad de factores que incluyen la naturaleza del agente (por ejemplo, su estabilidad en el entorno del tracto gastrointestinal), el estado del paciente (por ejemplo, si el paciente puede tolerar la administración oral), etc.

En la actualidad, la vía por pulverización o aerosol oral o nasal (por ejemplo, mediante inhalación) se utiliza muy comúnmente para suministrar agentes terapéuticos directamente a los pulmones y/o al sistema respiratorio. Sin embargo, la invención abarca la administración de la composición farmacéutica de la invención por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos.

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

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

1-5, etc.)

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran utilizando un dispositivo que administra una dosificación medida de la composición (por ejemplo, de agente de plegamiento interno).

Los dispositivos adecuados para su uso en la administración intradérmica de composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen dispositivos de aguja corta tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 4.886.499, patente de los Estados Unidos n.º 5.190.521, patente de los Estados Unidos n.º 5.328.483, patente de los Estados Unidos n.º 5.527.288, patente de los Estados Unidos n.º 4.270.537, patente de los Estados Unidos n.º 5.015.235, patente de los Estados Unidos n.º 5.141.496, patente de los Estados Unidos n.º 5.417.662. Las composiciones intradérmicas también pueden administrarse mediante dispositivos que limitan la longitud de penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como los descritos en el documento WO99/34850, y equivalentes funcionales de los mismos. Además, son adecuados los dispositivos de inyección de chorro que suministran composiciones líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro líquido o a través de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. Los dispositivos de inyección de chorro se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.480.381, patente de los Estados Unidos n.º 5.599.302, patente de los Estados Unidos n.º 5.334.144, patente de los Estados Unidos n.º 5.993.412, patente de los Estados Unidos n.º 5.649.912, patente de los Estados Unidos n.º 5.569.189, patente de los Estados Unidos n.º 5.704.911, patente de los Estados Unidos n.º 5.383.851, patente de los Estados Unidos n.º 5.893.397, patente de los Estados Unidos n.º 5.466.220, patente de los Estados Unidos n.º 5.339.163, patente de los Estados Unidos n.º 5.312.335, patente de los Estados Unidos n.º 5.503.627, patente de los Estados Unidos n.º 5.064.413, patente de los Estados Unidos n.º 5.520.639, patente de los Estados Unidos n.º 4.596.556, patente de los Estados Unidos n.º 4.790.824, patente de los Estados Unidos n.º 4.941.880, patente de los Estados Unidos n.º 4.940.460, documentos WO 97/37705 y WO 97/13537. Además, son adecuados los dispositivos de suministro balístico de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar las composiciones en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. Adicionalmente, pueden utilizarse jeringuillas convencionales en el método clásico de mantoux de administración intradérmica.

Formulaciones

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

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

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están formuladas para administrar una dosis de agente de plegamiento interno eficaz para competir con un polipéptido HA gripal para unirse a glucanos con topología de paraguas. En algunas realizaciones, tal unión por un polipéptido HA gripal se reduce después de la administración de una o más dosis de una composición de agente de plegamiento interno en comparación con su nivel en ausencia de tal administración. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están formuladas para administrar una dosis de agente de plegamiento interno eficaz para saturar al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más sitios de unión al polipéptido HA (por ejemplo, sitios de unión al polipéptido HA que contienen glucanos con topología de paraguas) presentes en el sujeto (por ejemplo, en las vías respiratorias del sujeto) que recibe la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para suministrar una dosis unitaria de agente de plegamiento interno dentro del intervalo de 0,0001 a 1000 nmg/kg.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran en múltiples dosis. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran en múltiples dosis/día. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran de acuerdo con una pauta posológica continua, de forma que el sujeto no experimente períodos de dosificación inferior a la terapéutica interpuestos entre períodos de dosificación terapéutica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran de acuerdo con una pauta posológica intermitente, de forma que el sujeto experimente al menos un período de dosificación inferior a la terapéutica interpuesto entre dos períodos de dosificación terapéutica.

Diagnóstico/kits

La presente divulgación proporciona kits para la detección de agentes de plegamiento interno como se describe en el presente documento, ya sea que tales polipéptidos sean agentes de plegamiento interno o no.

La presente divulgación proporciona kits para la detección de agentes de plegamiento interno y en particular para la detección de agentes de plegamiento interno con características particulares de unión a polipéptidos HA y/o glucanos

(por ejemplo, unión a glucanos de paraguas, a glucanos sialilados en α 2,6, a glucanos sialilados en α 2,6 largos, etc.) en muestras patológicas, incluyendo, pero sin limitación, sangre, suero/plasma, células mononucleares de sangre periférica/linfocitos de sangre periférica (CMSP/LSP), esputo, orina, heces, frotis faríngeo, hisopado de lesiones dérmicas, líquido cefalorraquídeo, citología del cuello uterino, muestras de pus, matrices alimentarias y tejidos de diversas partes del organismo, tal como cerebro, bazo e hígado. La presente divulgación también proporciona kits para la detección de agentes de plegamiento interno de interés en muestras ambientales, incluyendo, pero sin limitación, suelo, agua y flora. Otras muestras que no se han enumerado también pueden ser aplicables.

Los métodos para la detección de agentes de plegamiento interno implican proporcionar una muestra patológica y/o ambiental, poner en contacto la muestra con un agente de plegamiento interno y determinar si el agente de plegamiento interno se une a la muestra con respecto a un agente de unión de control negativo. Dichos métodos implican una etapa de procesamiento de la muestra (por ejemplo, someter la muestra a una o más etapas de purificación) antes de la etapa de puesta en contacto. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno proporcionados están marcados con una fracción detectable (por ejemplo, marcadores fluorescentes, radioactivos, quimioluminiscentes, etc.). Los agentes de plegamiento interno pueden ser detectables mediante métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia de Western, ELISA, inmunofluorescencia, etc.). Los agentes de plegamiento interno pueden estar inmovilizados (por ejemplo, en una perla, a una placa de microtitulación, a una matriz, a una matriz de glucanos, etc.) antes de la etapa de puesta en contacto.

Los kits pueden incluir uno o más agentes que detectan específicamente agentes de plegamiento interno con características particulares de unión a polipéptido HA y/o a glucanos. Dichos agentes de detección pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos que reconocen específicamente determinados agentes de plegamiento interno (por ejemplo, agentes de plegamiento interno que se unen a glucanos con paraguas y/o a glucanos sialilados en α 2,6 y/o a glucanos sialilados en α 2,6 largos), que puede utilizarse para detectar específicamente tales agentes de plegamiento interno mediante ELISA, inmunofluorescencia y/o inmunotransferencia.

Los anticuerpos que se unen a los agentes de plegamiento interno también se pueden utilizar en pruebas de neutralización de virus, en las que una muestra se trata con un anticuerpo específico para el agente de plegamiento interno de interés, y se analiza su capacidad para infectar células cultivadas con respecto a una muestra no tratada. Si el virus en esa muestra contiene tales agentes de plegamiento interno, el anticuerpo neutralizará el virus e impedirá que infecte las células cultivadas. Como alternativa o adicionalmente, tales anticuerpos también pueden utilizarse en pruebas de inhibición de HA, en las cuales la proteína HA se aísla de una muestra dada, se trata con un anticuerpo específico para un agente de plegamiento interno o un conjunto de agentes de plegamiento interno particular, y se analiza su capacidad para aglutinar los eritrocitos con respecto a una muestra no tratada. Si el virus en la muestra contiene tales agentes de plegamiento interno, el anticuerpo neutralizará la actividad de los agentes de plegamiento interno e impedirá que aglutine los eritrocitos (Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL Press, 1988; www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html; www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html). Dichos agentes pueden incluir ácidos nucleicos que se unen específicamente a nucleótidos que codifican agentes de plegamiento interno particulares y que pueden utilizarse para detectar específicamente tales agentes de plegamiento interno mediante RT-PCR o hibridación *in situ* (www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html; www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html). Los ácidos nucleicos que se han aislado de una muestra se amplifican antes de la detección. Los reactivos de diagnóstico pueden marcarse de forma detectable.

La presente invención también proporciona kits que contienen reactivos de acuerdo con la invención para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe. El contenido de los kits incluye, pero sin limitación, plásmidos de expresión que contienen nucleótidos de agentes de plegamiento interno (o partes características o biológicamente activas) que codifican agentes de plegamiento interno de interés (o partes características o biológicamente activas). Como alternativa o adicionalmente, los kits pueden contener plásmidos de expresión que expresan agentes de plegamiento interno de interés (o partes características o biológicamente activas). También pueden incluirse plásmidos de expresión que no contienen genes de virus, de modo que los usuarios puedan incorporar nucleótidos de agentes de plegamiento interno de cualquier virus de la gripe de interés. También se pueden incluir en los kits líneas celulares de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, las líneas celulares Vero y MDCK. Los reactivos de diagnóstico pueden marcarse de forma detectable.

Los kits para su uso en conformidad con la presente invención pueden incluir, una muestra de referencia, instrucciones para procesar muestras, realizar la prueba, instrucciones para interpretar los resultados, tampones y/u otros reactivos necesarios para realizar la prueba. Un kit puede comprender un panel de anticuerpos.

La presente divulgación proporciona kits para la administración de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, un kit que comprende al menos una dosis de un agente de plegamiento interno. Un kit que comprende una dosis unitaria inicial y una o más dosis unitarias posteriores de un agente de plegamiento interno. La dosis unitaria inicial puede ser mayor que las dosis unitarias posteriores o en donde todas las dosis son iguales.

Los kits (particularmente aquellos para la administración de composiciones farmacéuticas de agente de plegamiento

interno) pueden comprender al menos un componente de un dispositivo de administración, por ejemplo, un inhalador. Un kit puede comprender al menos un componente de un dispositivo de administración, por ejemplo, un inhalador y una dosis de un agente de plegamiento interno. Los kits proporcionados comprenden instrucciones de uso.

Ejemplos

Ejemplo 1. Diseño de agentes de plegamiento interno

El presente ejemplo ilustra el diseño de agentes de plegamiento interno para unirse a regiones específicas en un polipéptido HA.

Se diseñó una secuencia de plegamiento interno ejemplar contra la interfaz de unión de HA (Figura 6). Estas interacciones revelaron varios contactos potencialmente estabilizadores con los dominios de la cabeza (HA-1) y del tallo (HA-2) de la HA (Tabla 10). Se observa que una de las regiones de la proteína diseñada tiene los contactos hidrófobos estabilizadores y enlaces de hidrógeno deseados con los dominios HA-1 y HA-2, mientras que otra región destacada tiene interacciones hidrófobas estabilizadoras principalmente con HA-1, mientras que aún otra región tiene interacciones hidrófobas estabilizadoras principalmente con HA-2. Por lo tanto, se espera que la proteína de plegamiento interno diseñada en consideración se una a la interfaz tallo-cabeza de los dominios HA-1 y HA-2. Adicionalmente, como se esperaba, se observa que las proteínas diseñadas se adaptan a la N-glucosilación en la región MPER de la HA debido a su volumen significativamente menor que los anticuerpos (Figura 6). Por lo tanto, se sostiene que las proteínas diseñadas se unirán con buena afinidad tanto a las cepas de virus de la gripe con glucosiladas en MPER como a las no glucosiladas en MPER, sustentando la neutralización universal de la gripe.

Tabla 10

Caracterización estructural de la interfaz de unión proteína diseñada Plegamiento interno 2-HA	
Interfaz tallo-proteína (HA-2-plegamiento interno)	Interfaz cabeza-proteína (HA-1-plegamiento interno)
Número de restos de la interfaz (15: 11)	Número de restos de la interfaz (10 : 9)
Número de átomos de la interfaz (47 : 43)	Número de átomos de la interfaz (34 : 27)
Área de la interfaz accesible a disolventes (411,0 Å ² : 435,3 Å ²)	Área de la interfaz accesible a disolventes (241,7Å ² : 239,3Å ²)
Número de enlaces de hidrógeno: 4 Gln42_OE1 - Gly78_N Gln42_OE1 - Gly76_N Asp19_O - Tyr75_OH Thr49_OG1 - Arg26	Número de enlaces de hidrógeno: 3 Gln34_NE2 - Thr22_O Ser292_O - Thr22_OG1 Gln34_OE1 - Thr23_OG1
Restos importantes de la interfaz: Tallo: Val18, Asp19, Gly20, Trp21, Lys38, Thr41, Gln42, Ile45, Asp46, Val48, Thr49, Asn50, Val52, Asn53, Ile56 Plegamiento interno: Val21, Thr23, Ser25, Arg26, Phe49, Val74, Tyr75, Gly76, Arg77, Gly78, Asp79	Restos importantes de la interfaz: Cabeza: His12, Asn13, Ser16, Glu18, Thr31, His32, Gln34, Ser292, Met293, Thr319 Plegamiento interno: Glu18, Val21, Thr22, Thr23, Ser24, Ser25, Arg26, Phe49, Met50

Se sabe que dirigirse al suministro de productos terapéuticos de forma local en lugar de a nivel global proporciona un tratamiento inmensamente menos tóxico con mayor potencia. Además de las propiedades de amplio espectro de neutralización de la gripe, la capacidad de unirse específicamente a glucanos sialilados en α 2,6 en el receptor de HA se convierte en una propiedad importante de los nuevos productos terapéuticos para la gripe. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría, los inventores proponen las siguientes estrategias para la neutralización de amplio espectro dirigida de gripe, como se ilustra en la Figura 1. Incluyen la capacidad de unirse a la región epitópica proximal de membrana conservada glucosilada/no glicosilada de la HA (*neutralización de amplio espectro*) junto con la capacidad de unirse a los receptores con glucano sialilado en las vías respiratorias altas humanas (*suministro dirigido*).

Ejemplo 2. Los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA

El presente ejemplo ilustra la unión de agentes de plegamiento interno al polipéptido HA en un ensayo de unión *in vitro*.

Se recubrieron los pocillos de placas Maxisorp de 96 pocillos con 0,2 μ g de un polipéptido HA de distintos subtipos (H1, H3, H5, H7 y H9) y se dejó toda la noche a 4 °C. Las placas recubiertas con polipéptido HA se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con BSA al 1 % en PBST. Se añadieron a los pocillos recubiertos con polipéptido HA distintas

concentraciones de agentes de plegamiento interno junto con el anticuerpo C179 (control) y la placa se incubó a TA durante 2 horas. La placa se lavó tres veces con PBST y los pocillos que contenían agentes de plegamiento interno se incubaron con anticuerpo anti-6xHis de ratón (dilución 1:1000) durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con PBST y todos los pocillos se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón HRP durante 1 hora a TA. Después de la incubación, los pocillos se lavaron con PBST y la HRP unida se midió utilizando sustrato TMB. Se añadió sustrato TMB a los pocillos, se incubó durante 3 minutos, seguido de la adición de ácido sulfúrico 1 N. La absorbancia se midió a 450 nm.

Los resultados experimentales de los inventores muestran una buena concordancia con los cálculos teóricos predichos, con las proteínas diseñadas que presentan una alta afinidad hacia las cepas de virus de la gripe tanto glucosiladas en MPER como no glucosiladas en MPER. Los resultados de los inventores muestran que un agente de plegamiento interno ejemplar se une a diversos polipéptidos HA glucosilados y no glucosilados (H1, H3, H5, H7 y H9) con afinidades similares (Figura 7, panel izquierdo). Estos datos se comparan con el control de anticuerpos C179 (Figura 7, panel derecho), lo que muestra que el anticuerpo C179 no puede distinguir entre distintos clados del polipéptido HA.

Ejemplo 3. Afinidad de unión entre los agentes de plegamiento interno y las dianas de un agente de plegamiento interno

El presente ejemplo muestra un cálculo de afinidad de la unión, representada como una constante de disociación (K_d), entre un agente de plegamiento interno y la diana del agente de plegamiento interno. En este ejemplo, el agente de plegamiento interno es un agente de plegamiento interno ejemplar y la diana del agente de plegamiento interno es un polipéptido HA.

La afinidad de unión entre el agente de plegamiento interno ejemplar y un polipéptido HA es una función de las concentraciones tanto del agente de plegamiento interno como del polipéptido HA. En el presente ejemplo, la afinidad de unión se describe cuantitativamente utilizando constante de disociación (K_d). A continuación se describe un ejemplo de cómo medir la constante de disociación.

Se utilizaron placas recubiertas con polipéptido HA para realizar ensayos ELISA con un agente de plegamiento interno ejemplar como se describe anteriormente. Se utilizó la absorbancia medida a 450 nm para calcular la saturación fraccional del receptor. La saturación fraccional se representó en función de la concentración molar del agente de plegamiento interno. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$y = \frac{I_0}{(K_d + I_0)}$$

en que y es la saturación fraccional, I_0 es la concentración del agente de plegamiento interno y K_d es la constante de disociación.

Utilizando el cálculo al que se hace referencia anteriormente y aplicando el análisis de regresión, los inventores han observado valores de K_d en el intervalo de 0,1 a 500 nM para la unión de agentes de plegamiento interno a polipéptidos HA. En algunas realizaciones, los inventores han observado valores de K_d en el intervalo de 10 a 100 nM para la unión de agentes de plegamiento interno a polipéptidos HA. En algunas realizaciones, los inventores han observado valores de K_d en el intervalo de 50 a 100 nM para la unión de agentes de plegamiento interno a polipéptidos HA.

Ejemplo 4. Los agentes de plegamiento interno inhiben la infectividad del virus *in vitro*

El presente ejemplo ilustra la capacidad de los agentes de plegamiento interno para prevenir la infectividad del virus en ensayos de unión *in vitro*.

Se evaluó *in vitro* la capacidad de un agente de plegamiento interno para la inhibición de la infección por virus de la gripe utilizando células MDCK (riñón canino Madin-Darby), una línea de células epiteliales comúnmente utilizada para la propagación y el análisis de cepas de virus de la gripe. Los efectos inhibidores del agente de plegamiento interno sobre la infectividad se determinaron midiendo tanto la producción vírica como la extensión de los efectos citopáticos (EC) inducidos por el virus de la gripe en las células hospedadoras. Se empleó un ensayo de placas (Figuras 15 y 16) y qRT-PCR para cuantificar la producción vírica, y se utilizó un ensayo de viabilidad celular para medir los niveles de EC. Los experimentos se configuraron para permitir que el agente de plegamiento interno se uniera primero a su diana vírica durante un período de preincubación de una hora antes de la introducción en las células hospedadoras. La infección se llevó a cabo en presencia de bajos niveles de tripsina (1 μ M). El ensayo de placas se realizó inoculando una monocapa de células confluyente con diluciones en serie de muestras de prueba, y cubriendo con una suspensión viscosa del polímero Avicel (FMC Biopolymers). Las placas se dejaron desarrollar durante un período de 48 horas a 35 °C, se fijaron con formalina, se tiñeron con cristal violeta y visualizaron (Figuras 15 y 16). El recuento de las placas

se utilizó para calcular los títulos de los virus infecciosos en las muestras de prueba. La producción total de virus también se determinó por RT-PCR cuantitativa, que midió los niveles de copias del genoma vírico en las muestras infectadas. Se diseñaron cebadores y una sonda marcada para amplificar y medir específicamente una región dentro del gen de la hemaglutinina vírica mediante el método TaqMan. Se utilizó el número relativo de células viables después de la infección como una medida del EC. Se expusieron cultivos celulares subconfluentes a una mezcla de compuesto/virus ($moi = 1,0$) durante un período de una hora a 35 °C. El virus y el fármaco no unidos se eliminaron y a continuación se reemplazaron por medio de crecimiento de virus. La viabilidad celular se determinó después de 48 horas de incubación utilizando reactivos CellTiter Blue de Promega (resazurina) como lectura del grado de conversión metabólica de resazurina no fluorescente a resorufina fluorescente (excitación/emisión de 555/585 nm; SpectraMax M2; Molecular Probes).

A partir de estos estudios, los inventores han descubierto que los agentes de plegamiento interno inhiben la producción de placas inducida por el virus. En algunas realizaciones, los agentes de plegamiento interno inhiben la producción de placas inducida por virus de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 5. Los agentes de plegamiento interno se unen a polipéptidos HA *in vivo*

El presente ejemplo ilustra la capacidad de los agentes de plegamiento interno para unirse a polipéptidos HA *in vivo*.

Se adquirieron ratones BALB/c (de 4-6 semanas de edad) de Charles River Labs. Los ratones se pesaron y se dividieron en cuatro grupos de 6 ratones cada uno para el experimento. A cada grupo se le administró una dosis de isoflurano con 0 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,6 mg/kg o 6 mg/kg de agente de plegamiento interno, y se dejó recuperar (< 2 min). Después, se les readministró isoflurano y se expusieron por vía intranasal a una dosis letal del virus H1N1 PR8. Los ratones se controlaron diariamente durante 14 días. Se registraron diariamente la pérdida de peso, la puntuación visual y la supervivencia (Figuras 17 y 18). Los signos clínicos de la infección gripal en ratones incluyen postura encorvada, pelaje erizado, respiración rápida, pérdida de apetito, pérdida de peso y muerte. Además, el día 3 se recogieron lavados nasales de tres animales cada uno del grupo no tratado y el grupo al que se le dosificaron 6 mg/kg, para demostrar una reducción de la replicación vírica en la nariz con títulos máximos esperados en el día 3. Se recogieron los pulmones de cada ratón antes del sacrificio.

Los resultados de estos estudios han demostrado que los agentes de plegamiento interno pueden retrasar satisfactoriamente el inicio de la infección por H1N1 en ratones, con resultados que fueron comparables o extremadamente mejores que un tratamiento antivírico alternativo, la Ribavirina.

Ejemplo 6. Agentes de plegamiento interno en el diagnóstico

El presente ejemplo ilustra la capacidad de los agentes de plegamiento interno para proporcionar una forma rápida de (a) identificar la presencia del virus de la gripe en una muestra biológica y (b) caracterizar el virus, basándose en el subtipo.

Se utiliza un ensayo de ELISA tipo sándwich (ensayo ELISA de tipificación de virus) para identificar la presencia del virus de la gripe y caracterizar el subtipo de virus. Para el ensayo de ELISA de tipificación de virus, se recubrirán placas de 96 pocillos con 2 µg de agente de plegamiento interno y se incubarán durante una noche a 4 °C. Después, las placas se lavarán exhaustivamente con PBS y se bloquearán con BSA al 1 % en PBST durante 1 hora. Después del bloqueo, las placas se lavarán con PBST y se almacenarán a 4 °C hasta su uso posterior.

Las muestras biológicas sospechosas de contener virus de la gripe se diluirán en tampón de muestra (PBS) directamente o después del procesamiento. Las muestras diluidas se aplicarán a continuación a los pocillos recubiertos con agente de plegamiento interno y se incubarán durante 2 horas a temperatura ambiente (TA), seguido de un lavado exhaustivo. Por lo tanto, el virus de la muestra será capturado por el agente de plegamiento interno y se prestará para un análisis posterior. Se aplicará un anticuerpo específico de subtipo a los distintos pocillos durante 1 hora a TA. Después de lavados adicionales con PBST, se aplicarán a los pocillos anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Después de la incubación, los pocillos se lavarán y tratarán con sustrato TMB y ácido sulfúrico 1 N. Se medirá la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro. Se incluirán controles negativos y positivos apropiados.

Los resultados del ensayo de ELISA de tipificación de virus proporcionarán información sobre la presencia del virus de la gripe en una muestra y el subtipo del virus.

Ejemplo 7. Agentes de plegamiento interno para la caracterización de glucanos del virus de la gripe

El presente ejemplo ilustra la capacidad de los agentes de plegamiento interno como medio para enriquecer y marcar virus de la gripe para la caracterización de glucanos, utilizando un ensayo de tipificación de glucanos.

En el ensayo de tipificación de glucanos, los agentes de plegamiento interno se conjugarán con Qdot 525 Carboxyl Quantum Dots utilizando química EDC según las instrucciones del fabricante. Se añadirá el complejo Qdot-plegamiento interno a las muestras biológicas procesadas y se agitará bien durante 2 horas. A continuación se

centrifugará la muestra y el complejo Qdot-plegamiento-Pleg.A se lavará tres veces con PBST. Después, este complejo se aplicará en una matriz de glucanos (que contiene glucanos con topología de *paraguas* y de *cono*). Después de incubar durante 2 horas a TA, los pocillos se lavarían tres veces con PBST. La fluorescencia unida se mediría utilizando el espectrofotómetro SpectraMax M2e, utilizando el modo de lectura inferior.

Los resultados de este ensayo producirán información con respecto a la caracterización de los glucanos de los virus de la gripe.

Ejemplo 8. Evaluación de la CI_{50} del Plegamiento interno 28

Se ha cuantificado la CI_{50} de los agentes de plegamiento interno contra el virus de la gripe dirigidos a HA. Estos estudios utilizaron la cepa PR8 del virus de la gripe H1N1 (A/Puerto Rico/8/34). En resumen, se infectan células MDCK confluentes con PR8 [4E3 UFP/ml] preincubadas durante 40 minutos con concentraciones variables de agentes contra el virus de la gripe. Después de una hora de infección, los medios se retiraron y se reemplazaron por medios sin virus que contenían fármaco o medios sin virus sin fármacos, dependiendo del experimento. Después de 48 horas de incubación a 37 °C, en CO₂ al 5 %, se recogieron los sobrenadantes. Se aisló el ARN vírico y se cuantificó el título vírico mediante PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para la proteína M del virus.

La evaluación inicial de los valores de CI_{50} para el Plegamiento interno 28 se determinaron mediante un ensayo de microneutralización seguido de PCR cuantitativa (qPCR). Se preincubaron mezclas de virus (PR8) y de Plegamiento interno 28 a diversos títulos y concentraciones, respectivamente, durante 1 hora a 35 °C antes de su aplicación a cultivos de células MDCK en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (~ 10.000 células/pocillo). Después de 48 horas adicionales de incubación, se recogió de cada pocillo el medio de cultivo para la determinación de la producción vírica mediante qPCR. Un indicio preliminar de la actividad neutralizante del Plegamiento interno 28 provino de la tinción con cristal violeta de células que sobrevivieron a la infección (Figura 20; las células teñidas están en negro), lo que mostraron una inhibición dependiente de la concentración del fármaco y del título vírico.

Se combinaron los medios de muestras por triplicado y a continuación se sometieron a la cuantificación directa de la producción vírica mediante qPCR. Los títulos víricos se calcularon a partir de los valores de Ct de la PCR con la ayuda de una curva patrón interna y se determinaron los valores de la CI_{50} representando los títulos calculados frente a las concentraciones de Plegamiento interno 28 (Figura 21). Los resultados mostraron una inhibición del 50 % (CI_{50}) de 200 ufp/ml (moi = 0,04) de partículas de virus PR8 con 11 µg/ml de Plegamiento interno 28. Como se esperaba para un agente activo, este valor aumentó con el título vírico. Los resultados muestran que el Plegamiento interno 28 es un inhibidor potente; la CI_{50} está afectada por la multiplicidad de infección (moi).

Además, los inventores investigaron cómo el método de adición del Plegamiento interno 28 (es decir, en la cobertura, etc.) influyó en la inhibición. La CI_{50} del Plegamiento interno 28 se midió como de ~ 1 µg/ml o ~ 6 nM cuando el fármaco se añade a la cobertura después de la infección, y ~ 8 µg/ml o ~ 50 nM cuando el fármaco no se añade a la cobertura después de la infección (Figura 22). Al menos otro agente de plegamiento interno analizado de la Tabla 9 mostró una CI_{50} comparable, mientras que se observó una actividad menos potente con al menos otro agente de este tipo. Los expertos en la materia apreciarán que la orientación proporcionada en el presente documento permite el ajuste y la optimización de los agentes de plegamiento interno basándose en los agentes representativos proporcionados en la Tabla 9, sin experimentación excesiva.

Ejemplo 9. Ensayo de actividad inhibidora mínima

Los inventores han utilizado un método para determinar la concentración inhibidora mínima (CIM) de los agentes antivíricos contra la gripe A. Para ser activo en este ensayo, el agente debe unirse al virus y neutralizar la capacidad del virus para formar placas. Brevemente, se diluye en serie un agente en incrementos de dos veces en PBS para formar un gradiente de concentración a través de múltiples pocillos. Se añade a cada pocillo un número conocido de unidades formadoras de placas víricas y, después de 1 hora de incubación, se añade la mezcla a una monocapa de MDCK para permitir la unión del virus. La cobertura de Avicel fomenta la formación de las placas y las placas se visualizan mediante inmunotinción. La concentración más baja de agente para impedir la formación de placas se informa como la CIM. Estos estudios utilizaron la cepa PR8 del H1N1 (A/Puerto Rico/8/34).

Los agentes de plegamiento interno representativos, incluyendo el Plegamiento interno 28, de la Tabla 9, mostraron actividad en el ensayo frente a H1N1, y mostraron específicamente un CIM <120, e incluso dentro de un intervalo de 15 a aproximadamente 100, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 60, o de aproximadamente 15-20 a aproximadamente 60-100. Los agentes de plegamiento interno analizados en este ensayo no mostraron actividad frente a un virus H3N2 en los estudios particulares realizados. Al menos en algunos casos en que no se observó actividad (ya sea frente a H1N1, H3N2, o ambos) puede haber habido problemas con la estabilidad del agente de plegamiento interno en el ensayo. Los expertos en la materia apreciarán que las mejoras en la estabilidad de tales agentes (por ejemplo, mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos o de la cadena principal), la infusión constante o repetida del agente u otros ajustes experimentales en los agentes y/o las condiciones del ensayo, pueden revelar actividad no vista en la prueba particular realizada hasta ahora.

Ejemplo 10. PEGilación de Plegamiento interno 28

Se añadieron diversos PEG al Plegamiento interno 28 y se determinó la CIM. Los inventores observaron una tendencia en que la PEGilación con moléculas de PEG más grandes (por ejemplo, de 20 kD) afecta negativamente el desempeño del Plegamiento interno 28 en los ensayos de CIM, mientras que las moléculas de PEG más pequeñas (por ejemplo, de 5 kD) parecen ser mejor toleradas.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Massachusetts Institute of Technology

<120> AGENTES POLIPEPTÍDICOS TÉCNICAMENTE DISEÑADOS PARA LA NEUTRALIZACIÓN DIRIGIDA DE AMPLIO ESPECTRO DE LA GRIPE

15 <130> 0492612-0811

<150> US 61/298.776

<151> 27/01/2010

20 <160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 1

Met Glu His Pro Val Ala Thr Leu Ser Thr Val Glu Arg Arg Ala Ile

1 5 10 15

Asn Leu Thr Trp Thr Lys Pro Phe Asp Gly Asn Ser Pro Leu Ile Arg

20 25 30

Tyr Ile Leu Glu Met Ser Glu Asn Asn Ala Pro Trp Thr Val Leu Leu

35 40 45

Ala Ser Val Asp Pro Lys Ala Thr Ser Val Thr Val Lys Gly Leu Val

50 55 60

Pro Ala Arg Ser Tyr Gln Phe Arg Leu Cys Ala Val Asn Asp Val Gly

65 70 75 80

Lys Gly Gln Phe Ser Lys Asp Thr Glu Arg Val Ser Leu Pro Glu

85 90 95

35 <210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

ES 2 802 623 T3

<400> 2

Met Pro Ser Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
1 5 10 15

Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Trp Thr Met Ser

20

25

30

Ser Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
35 40 45

Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Phe Met Gly Gly Lys Ser Thr Ala
50 55 60

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

Ala Val Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser
85 90 95

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

5

<210> 3

<211> 95

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

15

<400> 3

ES 2 802 623 T3

Met Glu His Pro Val Ala Thr Leu Ser Thr Val Glu Arg Arg Ala Ile
1 5 10 15

Gln Leu Thr Trp Asp Ala Pro Val Thr Thr Ser Ser Arg Arg Tyr Ile
20 25 30

Leu Glu Met Ser Glu Asn Asn Ala Pro Trp Thr Val Leu Leu Thr Val
35 40 45

Pro Gly Phe Met Gly Gly Lys Thr Ser Val Thr Val Lys Gly Leu Val
50 55 60

Pro Ala Arg Ser Tyr Gln Phe Arg Leu Cys Ala Val Asn Tyr Val Gly
65 70 75 80

Lys Gly Gln Phe Ser Lys Asp Thr Glu Arg Val Ser Leu Pro Glu
85 90 95

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 4

Met Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Val Thr Thr Ser Ser Arg Tyr Tyr Arg
20 25 30

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr
35 40 45

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

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Arg
65 70 75 80

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Gly Gly Ser
100 105

<210> 5

ES 2 802 623 T3

<211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 5

```

Met Gly Ser Leu Glu Val Val Ala Ala Ser Gly Ala Asp Ser Leu Leu
1          5          10          15

Ile Ser Trp Asp Ala Pro Phe Thr Ile Tyr Ser Arg Tyr Tyr Arg Ile
          20          25          30

Thr Tyr His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu
          35          40          45

Pro Tyr Leu Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Phe Met Gly Gly Lys Ser
          50          55          60

Thr Ala Thr Ile Arg Asn Val Thr Glu Asp Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65          70          75          80

Tyr Ala Val Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
          85          90          95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Asp Val

```

100

10

<210> 6
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

20

<400> 6

ES 2 802 623 T3

Met Ser Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln
1 5 10 15

Val Gln Phe Lys Arg Pro Ser Arg Thr Val Pro Ile Tyr His Tyr Lys
20 25 30

Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val Trp His Ser Lys Trp Tyr
35 40 45

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

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

Gly Arg Ser Ser Ala Ala Ser Glu Phe Lys Thr Gln Pro
85 90

<210> 7
<211> 83
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 7

Met Ala Gly Ser Pro Ala Asn Ala Ser Thr Ser Gly Gly Asp Val Glu
1 5 10 15

Phe Thr Cys Arg Val Phe Thr Asp Tyr Pro His Ile Gln Trp Ile Leu
20 25 30

His Val Glu Tyr Leu Lys Val Leu Thr Ala Ala Tyr Lys Lys Arg Lys
35 40 45

Glu Thr Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr
50 55 60

Cys Leu Ala Gly Asn Asn Glu Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu

<210> 8
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de plegamiento interno sintético

ES 2 802 623 T3

<400> 8

Met Gly Ser Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Pro Phe Thr Ile Ser Phe Val
20 25 30

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

Gly Tyr Lys Lys Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
50 55 60

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Tyr Gly Lys Pro Ser Asn
65 70 75 80

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
85

5

<210> 9

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 9

15

Met Val Tyr Glu Leu Gln Val Gln Lys Ser Val Thr Val Gln Glu Gly
1 5 10 15

Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Ser Phe Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Phe Tyr Val Tyr Trp Phe Arg Asp Gly Gly His Gly Tyr Tyr Ala
35 40 45

Glu Val Val Ala Thr Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala
50 55 60

ES 2 802 623 T3

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

Asn Cys Ser Leu Ser Ile Gly Asp Ala Arg Met Glu Asp Thr Gly Ser
85 90 95

Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys
100 105 110

Arg Asp Val Lys Tyr Ser Tyr Gln Gln Asn Lys Leu Asn Leu Glu Val
115 120 125

Thr Ala Leu Ile
130

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 10

Met Val Tyr Glu Leu Gln Val Gln Lys Ser Val Thr Val Gln Glu Gly
1 5 10 15

Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Ser Phe Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Phe Tyr Val Tyr Trp Phe Arg Asp Gly Gly His Gly Tyr Tyr Ala
35 40 45

Glu Val Phe Tyr Thr Thr Ser Pro Gly Phe Met Gly Gly Lys Asn Cys
50 55 60

Ser Leu Ser Ile Gly Asp Ala Arg Met Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Phe
65 70 75 80

Phe Arg Val Glu Arg Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Arg Asp
85 90 95

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

<210> 11

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

ES 2 802 623 T3

<400> 11

```

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly
 1          5          10          15

Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Gly Val Ser Asn Val Thr Ile Ser Ser
 20          25          30

His Thr Met Asn Trp Val Arg Arg Val Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp
 35          40          45

Val Ala Ser Ile Ser Thr Met Phe Thr Tyr Arg Asp Tyr Ala Asp Ala
 50          55          60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Leu Glu Asp Phe Val
 65          70          75          80

Tyr Leu Gln Met His Lys Met Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85          90          95

Cys Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe
100          105          110

Asp Ala Trp Gly Pro Gly Thr Val Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115          120          125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gln Pro Gly Met Thr Gln
130          135          140

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

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
165          170          175

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu
180          185          190

Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
195          200          205

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Phe Asp Asp Phe Ala Thr Tyr
210          215          220

His Cys Gln His Tyr Ala Gly Tyr Ser Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr
225          230          235          240

Arg Val Glu Ile Lys

```

245

5	<210> 12
	<211> 244
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
10	<220>
	<223> Péptido de plegamiento interno sintético
	<400> 12

ES 2 802 623 T3

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Gly Val Ser Asn Val Thr Ile Ser Ser
20 25 30

His Thr Met Asn Trp Val Arg Arg Val Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Ser Ile Ser Thr Met Phe Thr Tyr Arg Asp Tyr Ala Asp Ala
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Leu Glu Asp Phe Val
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met His Lys Met Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

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

Ala Trp Gly Pro Gly Thr Val Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gln Pro Gly Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Lys
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Phe Asp Asp Phe Ala Thr Tyr His
210 215 220

Cys Gln His Tyr Ala Gly Tyr Ser Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
225 230 235 240

Val Glu Ile Lys

<210> 13
<211> 123
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 13

Met Val Gln Leu Val Glu Ala Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Asp Leu Arg Cys Gly Val Ser Asn Val Thr Ile Ser Ser His
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Thr Met Phe Thr Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Ala Asp Leu Glu Asp Ser Val Ser
65 70 75 80

Leu Gln Met His Lys Met Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Trp Gly Pro Gly Thr Val Val Thr Val Ser Pro
115 120

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 14

Met Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Ser Thr Ser

ES 2 802 623 T3

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

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 15

ES 2 802 623 T3

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

<210> 16

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 16

ES 2 802 623 T3

Met Pro Ser Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
1 5 10 15

Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Thr Thr Gly Lys Ala Ser
20 25 30

Ser Leu Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
35 40 45

Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ala Phe Met Gly Gly Trp Val Lys Ala
50 55 60

Thr Ile Arg Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

<210> 17

<211> 93

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 17

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

Ser Trp Asp Ala Pro Val Thr Thr Ser Ser Arg Tyr Tyr Ile Ile Glu
20 25 30

Met Ser Glu Thr Asn Ala Pro Trp Thr Val Leu Phe Thr Val Pro Gly

ES 2 802 623 T3

35

40

45

Phe Met Gly Gly Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Phe Arg Val Cys Ala Val Asn Tyr Val Gly Lys Gly
65 70 75 80

Gln Phe Ser Lys Asp Thr Glu Asn Val Arg Leu Glu Ile
85 90

<210> 18

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 18

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

Ser Trp Asp Ala Pro Val Thr Thr Val Ser Thr Tyr Arg Ile Thr Tyr
20 25 30

Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Ser Thr
35 40 45

Met Gly Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
50 55 60

Ile Thr Ala Gly Thr Trp Gly Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Arg Lys Gly Ser Asp
85 90 95

Arg Leu Ser Asp Asn Asp Pro Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
100 105 110

Arg Thr Glu Ile
115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 802 623 T3

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 19

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

Ser Trp Asp Ala Pro Val Thr Thr Val Ser Thr Tyr Tyr Ile Ile Glu
20 25 30

Met Ser Glu Thr Asn Ala Pro Trp Thr Val Glu Phe Thr Val Ser Thr
35 40 45

Met Gly Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
50 55 60

Ile Thr Ala Gly Thr Trp Gly Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Phe Arg Val Cys Ala Val Arg Lys Gly
85 90 95

Ser Asp Arg Leu Ser Asp Asn Asp Pro Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile
100 105 110

Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
115

5

<210> 20

<211> 98

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

15

<400> 20

ES 2 802 623 T3

Met Pro Pro Ala Val Gln His Leu Thr Ala Glu Val Thr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Gly Glu Tyr Gln Val Leu Ala Arg Trp Arg Tyr Pro Lys Asp Arg Lys
20 25 30

Tyr Gln Ser Phe Leu Gln Arg Leu Thr Val Thr Ala Asp Asp Gly Ser
35 40 45

Glu Arg Leu Val Ser Thr Ala Arg Thr Arg Glu Thr Thr Tyr Arg Phe
50 55 60

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

Ala Trp Arg Gln Gln Gly Asp Pro Ala Ser Val Ser Phe Arg Ile Ala
85 90 95

Ala Pro

<210> 21

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 21

ES 2 802 623 T3

Met Gly Pro Gln Gly Phe Pro Trp Arg Leu His Val Thr Gly Leu Thr
1 5 10 15

Thr Ser Thr Thr Glu Leu Ala Trp Asp Pro Pro Lys Tyr Ser Glu His
20 25 30

Asn Ile Phe Ile Arg Ser Tyr Thr Val Val Phe Arg Asp Ile Asn Ser
35 40 45

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

Thr Gly Leu Lys Pro Asp Thr Thr Tyr Asp Ile Lys Val Arg Ala Trp
65 70 75 80

Thr Tyr Thr Arg Ser Gly Pro Leu Ser Pro Ser Ile Gln Ser Arg Thr
85 90 95

Met Pro

<210> 22

<211> 196

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 22

Met Glu His Pro Val Ala Thr Leu Ser Thr Val Glu Arg Arg Ala Ile
1 5 10 15

Gln Leu Thr Trp Asp Ala Pro Val Thr Thr Ser Ser Arg Arg Tyr Ile
20 25 30

Leu Glu Met Ser Glu Asn Asn Ala Pro Trp Thr Val Leu Leu Thr Val
35 40 45

ES 2 802 623 T3

Pro Gly Phe Met Gly Gly Lys Thr Ser Val Thr Val Lys Gly Leu Val
50 55 60

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

Lys Gly Gln Tyr Ser Lys Asp Thr Glu Arg Val Ser Leu Pro Glu Glu
85 90 95

Pro Pro Thr Ala Pro Pro Gln Asn Val Ile Ala Ser Gly Arg Thr Asn
100 105 110

Gln Ser Ile Met Ile Gln Trp Gln Pro Pro Pro Glu Ser His Gln Asn
115 120 125

Gly Ile Leu Lys Gly Tyr Ile Ile Arg Tyr Asn Asn Ala Gly Asn Pro
130 135 140

Val Gly Tyr Gln Phe Lys Asn Ile Thr Asp Ala Asp Val Asn Asn Leu
145 150 155 160

Leu Leu Glu Asp Leu Thr Ser Gly Thr Asn Tyr Glu Ile Glu Val Ala
165 170 175

Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Leu Gly Val Tyr Ser Ser Lys Val Thr Glu
180 185 190

Trp Thr Leu Gln
195

<210> 23

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 23

ES 2 802 623 T3

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

<210> 24
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

5

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

ES 2 802 623 T3

<210> 25
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 25

10

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

<210> 26
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

20

<400> 26

ES 2 802 623 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 27

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 27

ES 2 802 623 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gly Ser Ser Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 28

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Met Gly His Pro Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 802 623 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Met Gln Met Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 29

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 29

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 30

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

5

<400> 30

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 31

10 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 31

ES 2 802 623 T3

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

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de plegamiento interno sintético
<400> 32

ES 2 802 623 T3

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

<210> 33

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 33

ES 2 802 623 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gly Ser Ser Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 34

ES 2 802 623 T3

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

<210> 35

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 35

ES 2 802 623 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Met Gly His Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 36

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 36

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

ES 2 802 623 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 37

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 37

ES 2 802 623 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gly Ser Ser Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 38

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 38

ES 2 802 623 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Met Gly His Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Met Gln Met Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 39

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 39

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

ES 2 802 623 T3

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Met Gly His Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 40

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 40

ES 2 802 623 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu Met Thr Met Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Met Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Pro Met Met Gly His Pro Asn Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Gln Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Met Gln Met Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 41

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de plegamiento interno sintético

<400> 41

ES 2 802 623 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un agente de plegamiento interno que se une a un polipéptido hemaglutinina (HA) y comprende un polipéptido de menos de aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud, cuya secuencia de aminoácidos consiste en el Plegamiento interno 1 de la SEQ ID NO: 1, Plegamiento interno 2 de la SEQ ID NO: 2, Plegamiento interno 3 de la SEQ ID NO: 3, Plegamiento interno 4 de la SEQ ID NO: 4, Plegamiento interno 5 de la SEQ ID NO: 5, Plegamiento interno 6 de la SEQ ID NO: 6, Plegamiento interno 7 de la SEQ ID NO: 7, Plegamiento interno 8 de la SEQ ID NO: 8, Plegamiento interno 9 de la SEQ ID NO: 9, Plegamiento interno 10 de la SEQ ID NO: 10, Plegamiento interno 11 de la SEQ ID NO: 11, Plegamiento interno 12 de la SEQ ID NO: 12, Plegamiento interno 13 de la SEQ ID NO: 13, Plegamiento interno 14 de la SEQ ID NO: 14, Plegamiento interno 15 de la SEQ ID NO: 15, Plegamiento interno 16 de la SEQ ID NO: 16, Plegamiento interno 17 de la SEQ ID NO: 17, Plegamiento interno 18 de la SEQ ID NO: 18, Plegamiento interno 19 de la SEQ ID NO: 19, Plegamiento interno 20 de la SEQ ID NO: 20, Plegamiento interno 21 de la SEQ ID NO: 21, Plegamiento interno 22 de la SEQ ID NO: 22, Plegamiento interno 23 de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 24 de la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 25 de la SEQ ID NO: 26 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 26 de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 27 de la SEQ ID NO: 28 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 28 de la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 29 de la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 30 de la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 31 de la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 32 de la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 33 de la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 34 de la SEQ ID NO: 35 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 35 de la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 36 de la SEQ ID NO: 37 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 37 de la SEQ ID NO: 38 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 38 de la SEQ ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 24, Plegamiento interno 39 de la SEQ ID NO: 40 y la SEQ ID NO: 24, o Plegamiento interno 40 de la SEQ ID NO: 41 y la SEQ ID NO: 24.
2. El agente de plegamiento interno de la reivindicación 1, en donde el agente de plegamiento interno comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en el Plegamiento interno 3 (SEQ ID NO: 3).
3. El agente de plegamiento interno de la reivindicación 1, en donde el agente de plegamiento interno comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en el Plegamiento interno 28 (SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 24).
4. El agente de plegamiento interno de la reivindicación 1, en donde el agente de plegamiento interno comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en el Plegamiento interno 22 (SEQ ID NO: 22).
5. Una composición farmacéutica que comprende el agente de plegamiento interno como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo biocompatible.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un agente farmacéutico.
7. Un agente de plegamiento interno como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 5, para su uso en un método de tratamiento de la infección por gripe A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el agente de plegamiento interno como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el sujeto ha estado expuesto a una fuente infectada seleccionada del grupo que consiste en un ave, un ser humano y un cerdo.
8. El agente de plegamiento interno o la composición farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el método comprende administrar el agente de plegamiento interno o la composición farmacéutica en combinación con uno o más agentes farmacéuticos.
9. El agente de plegamiento interno para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde el tratamiento es para el virus de la gripe A subtipo H1N1.
10. El agente de plegamiento interno para su uso como se reivindica en la reivindicación 9, en donde el agente de plegamiento interno comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en el Plegamiento interno 28 (SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 24).

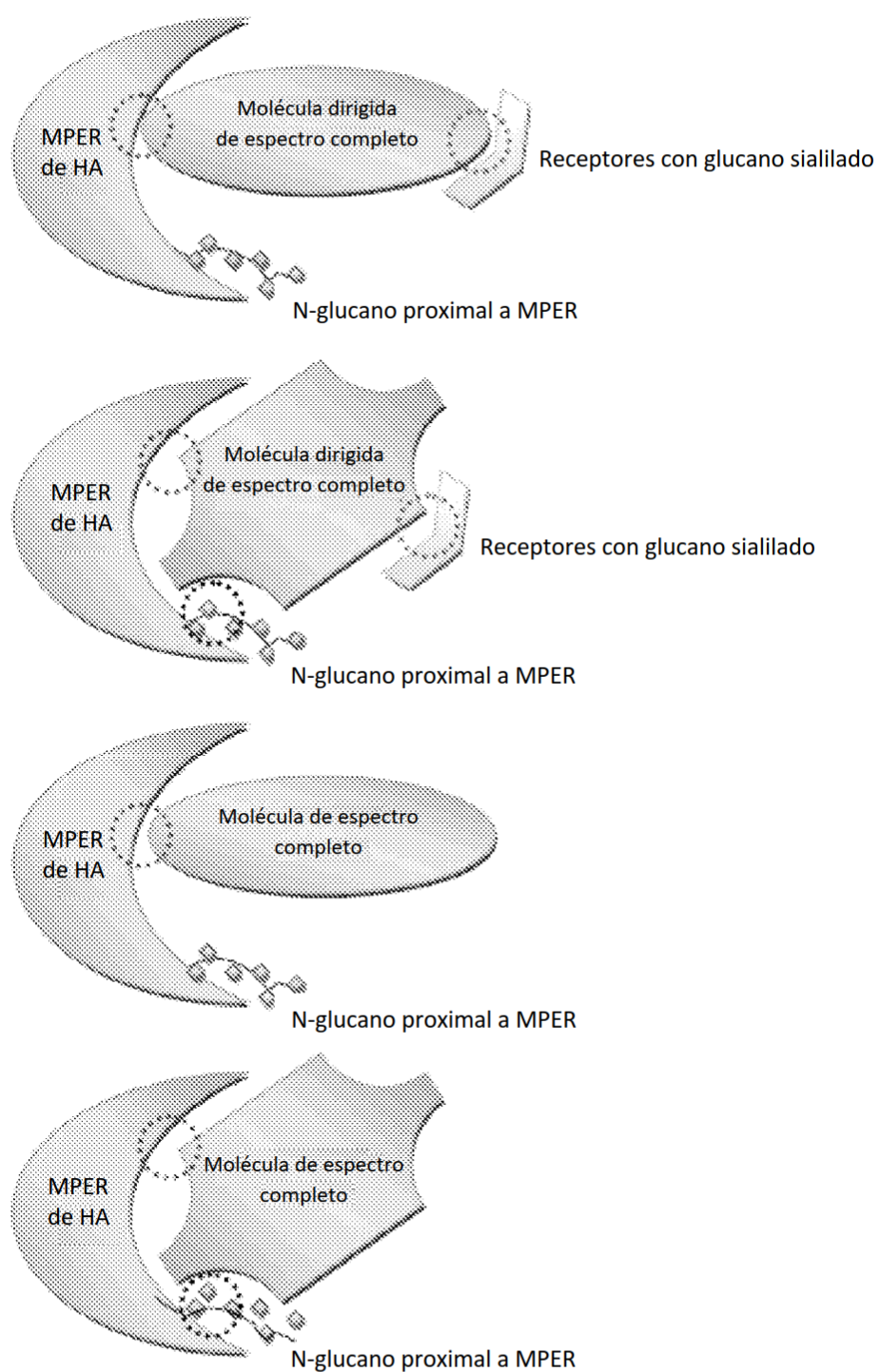


FIG. 1

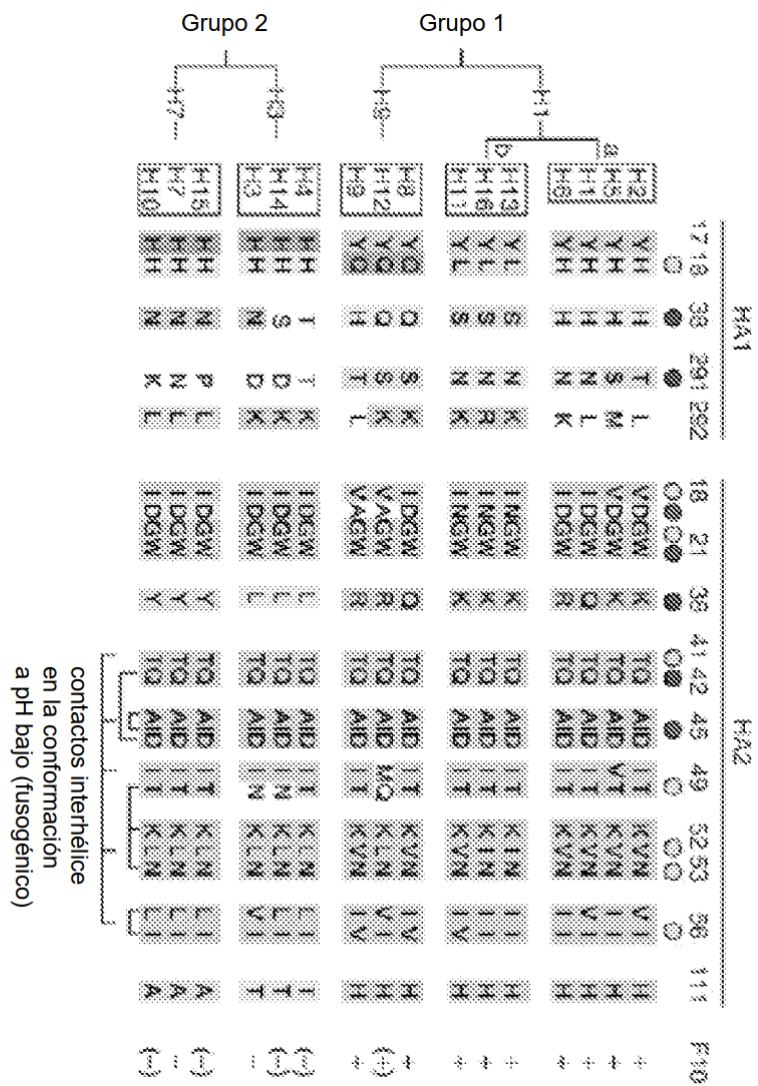


FIG. 2

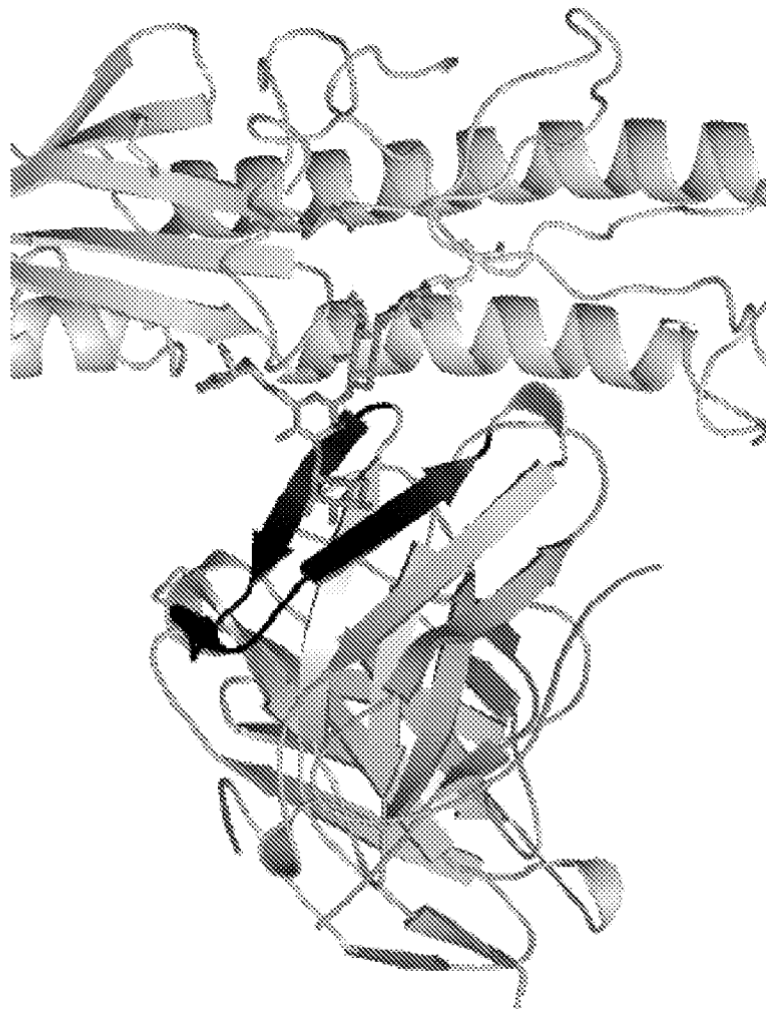


FIG. 3

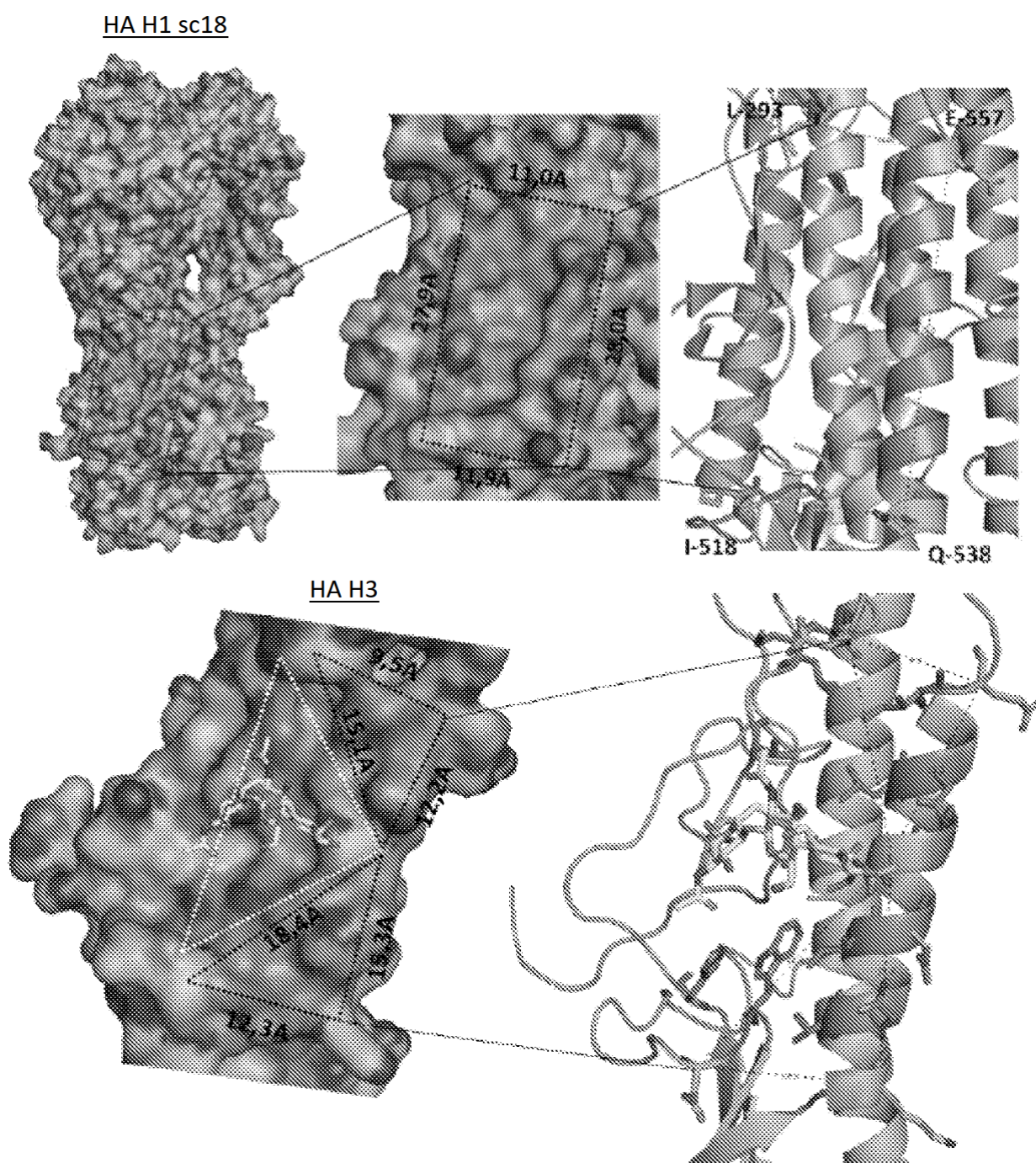
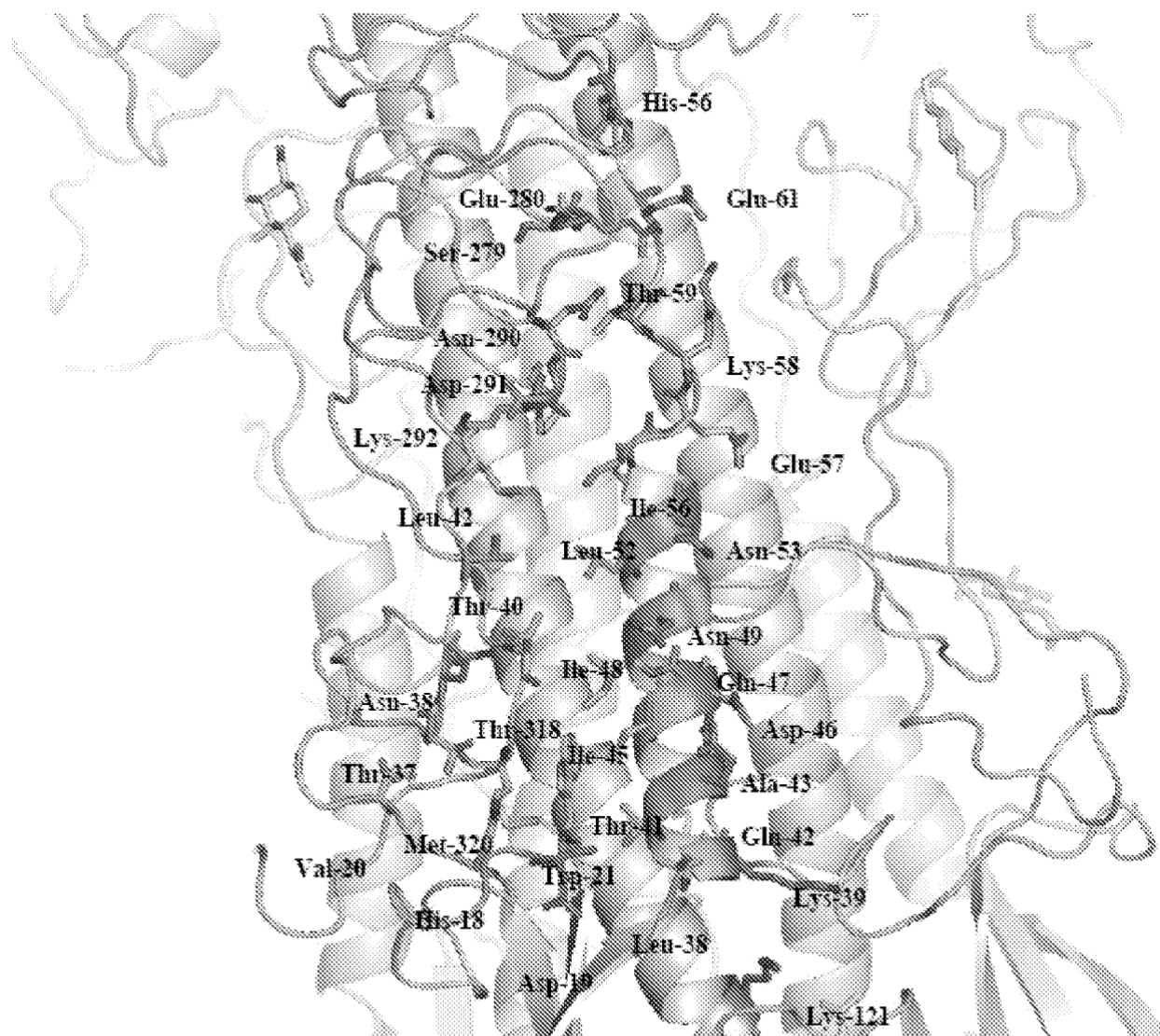


FIG. 4



CLAVE: Restos hidrófobos grupo 1
Restos hidrófobos grupo 2
Restos polares/cargados grupo 3
Restos polares/cargados grupo 4

FIG. 5



FIG. 6

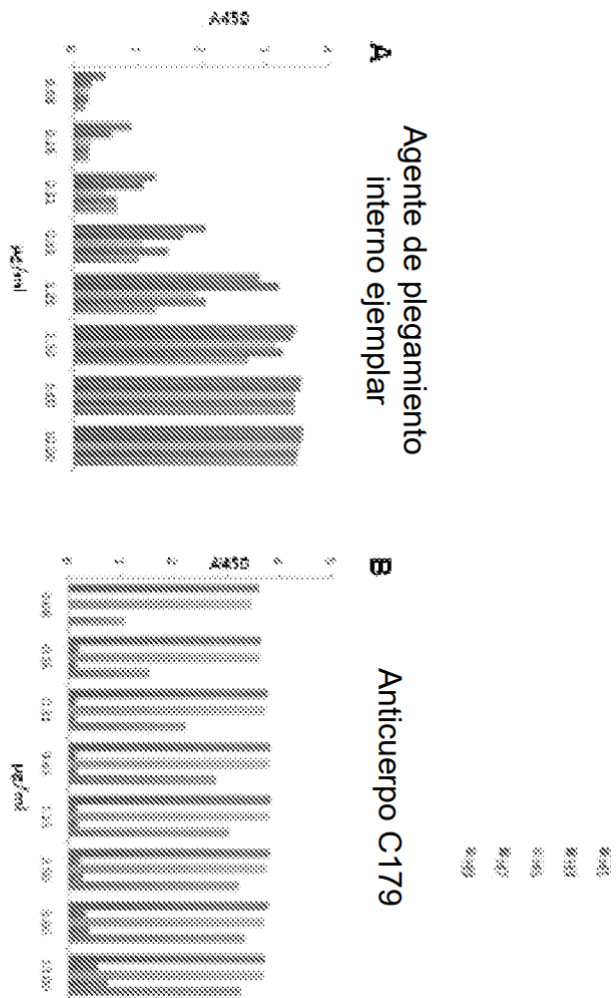


FIG. 7

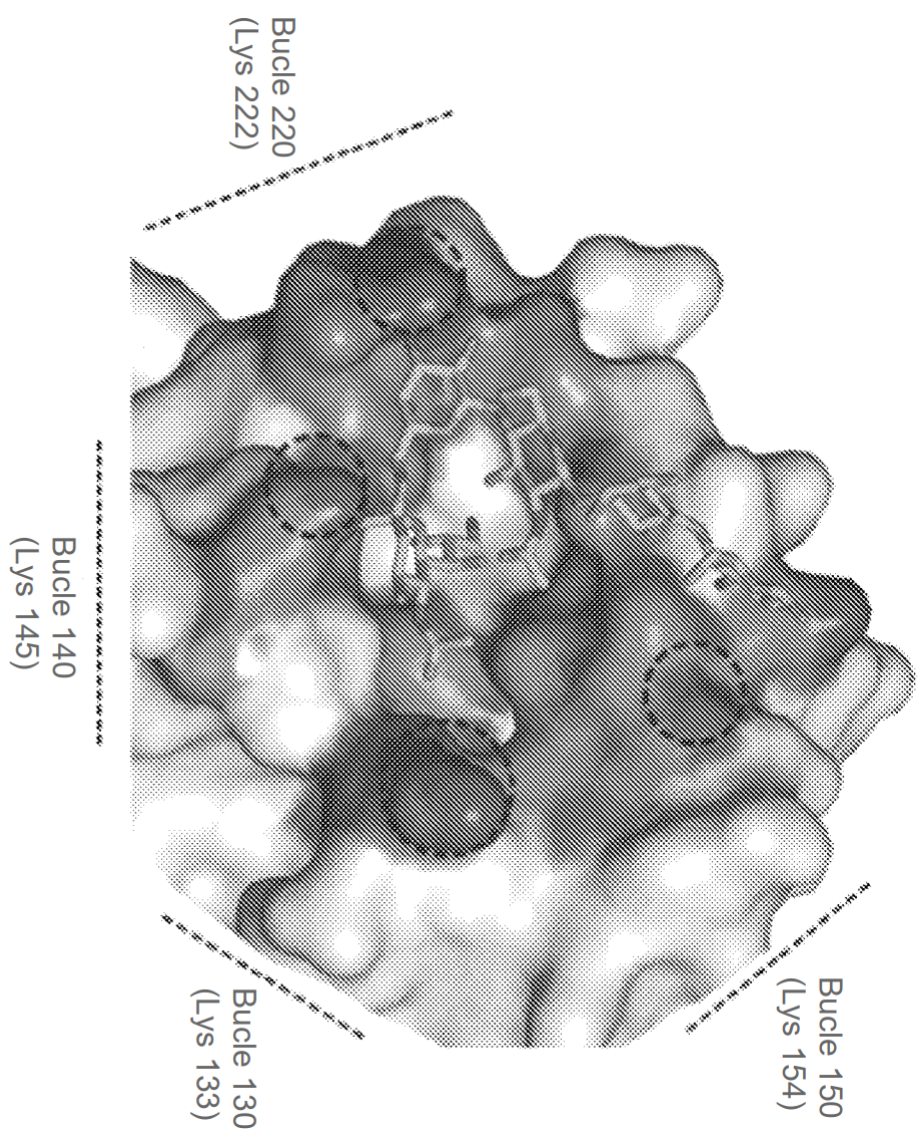


FIG. 8

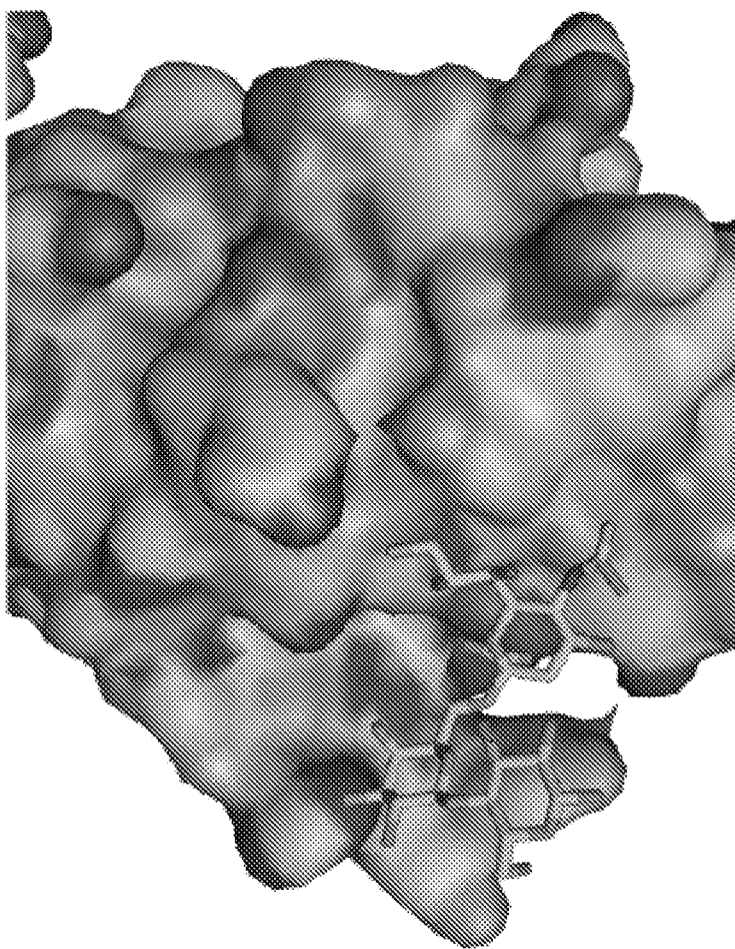


FIG. 9

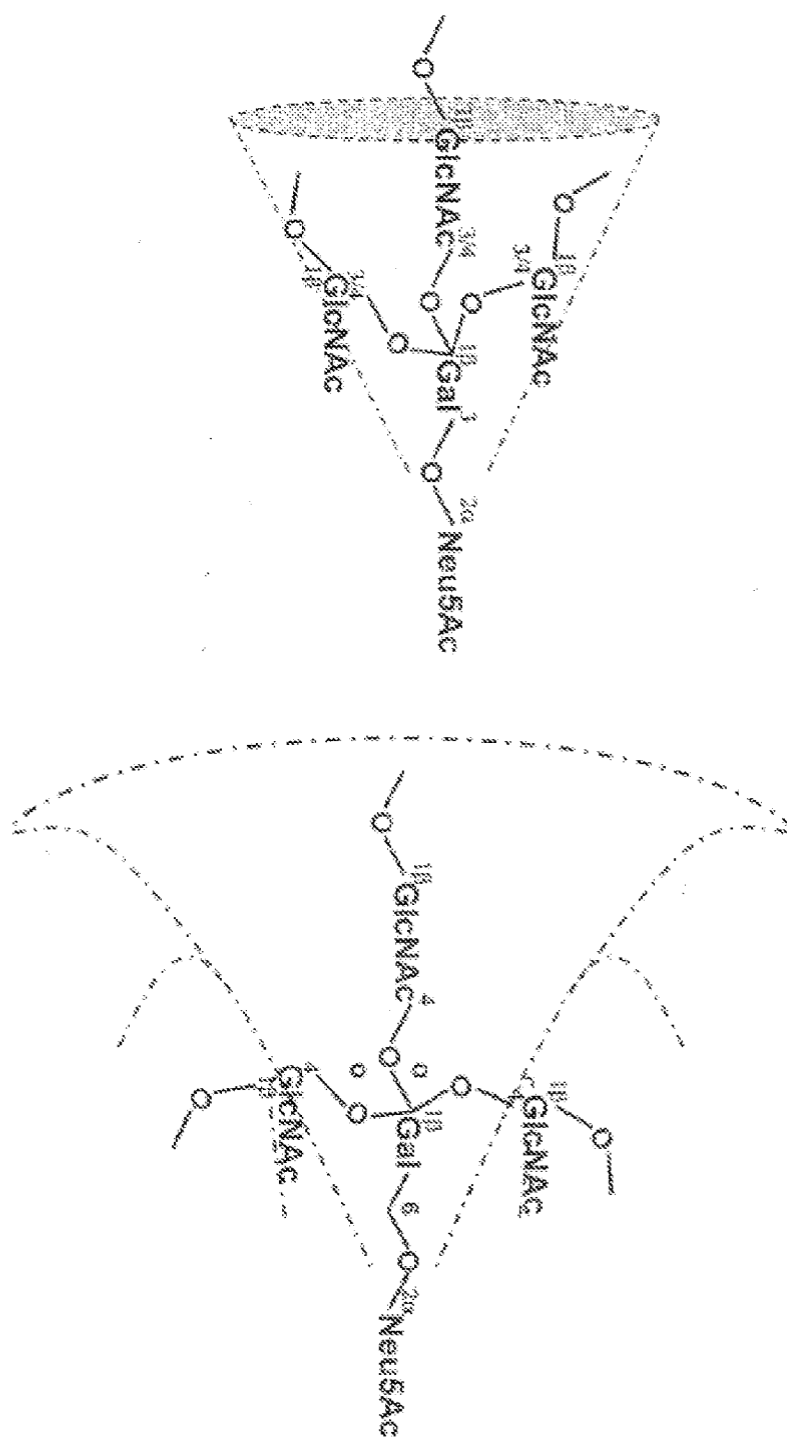


FIG. 10

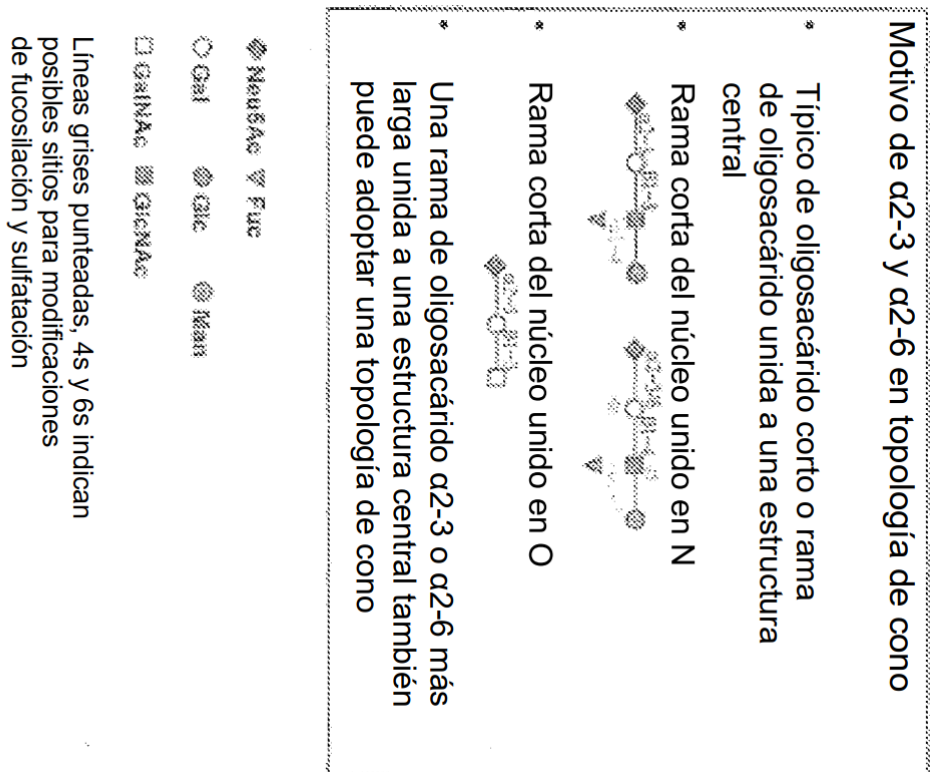


FIG. 11

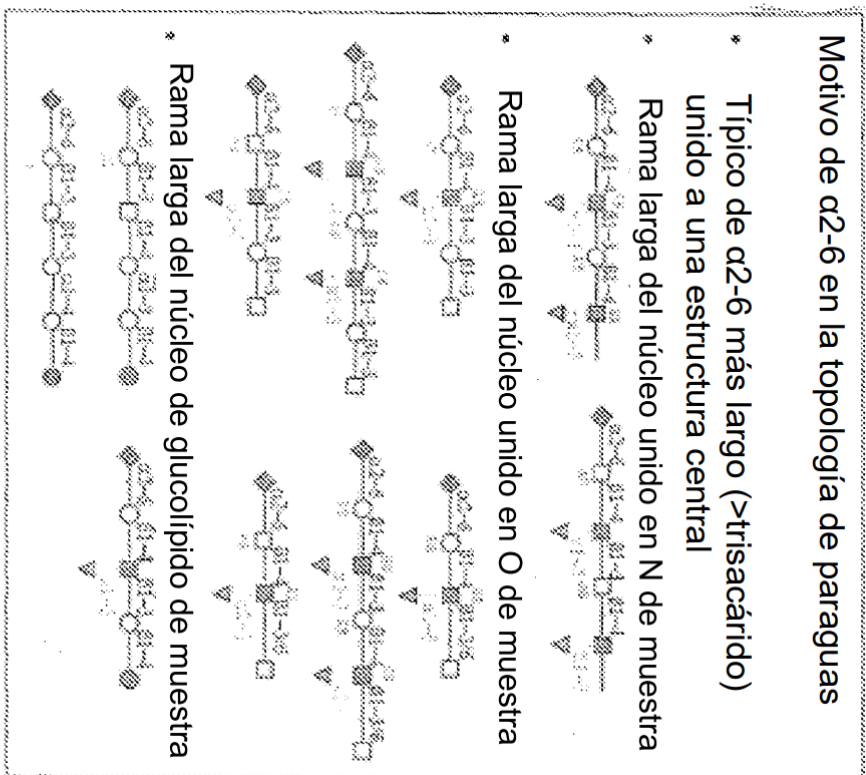


FIG. 12

Resido	Numero (H1 seq18)	Residos muy preferentes en un radio de 4,0-7,0 Å	Otros residuos permitidos en un radio de 4,0-7,0 Å
Trp	HA2 -- 21	Tyr, Ile, Met, Phe, His, Cys, Pro	Gly, Val, Arg, Ser, Thr, Trp, Leu, Ala
Ile	HA2 -- 45	Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp, Cys	Tyr, Pro, Ala, Thr
Asp	HA2 -- 19	Arg, Lys, His, Ser, Thr, Asn	Tyr, Gly, Gln, Glu, Asp, Pro, Ala
Asn		Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, Thr, Lys	His, Arg, Tyr, Gly, Ala, Trp, Pro
Ala		Ile, Val, Ala, Gly	Phe, Leu, Cys, Met, Tyr, Trp, Pro, Thr
His	HA1 -- 18	His, Asp, Glu, Trp, Tyr, Asn	Cys, Met, Phe, Thr, Ser, Gly, Ala, Pro, Arg, Lys
Gln		Lys, Asn, Arg, Glu, Asp, Gln	Pro, His, Met, Tyr, Ala, Gly, Ser, Thr
Leu		Met, Cys, Phe, Ile, Leu, Val, Tyr	His, Trp, Gly, Ala, Ser, Asp, Pro
Ile	HA2 -- 18	Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp, Cys	Tyr, Pro, Ala, Thr
Val		Val, Leu, Ile, Phe	Cys, Met, Trp, Tyr, Ala, Gly, Thr, Pro
Gly	HA2 -- 20	Gly, Ala, Cys, Met, Ser, Pro	Gly, Ala, Asn, Asp, Arg, Phe, Trp, His, Tyr, Gln, Lys
Thr	HA2 -- 41	Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln	Met, Ile, Val, Tyr, Ala, Gly, His, Arg, Lys, Pro
Thr	HA2 -- 49	Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln	Met, Ile, Val, Tyr, Ala, Gly, His, Arg, Lys, Pro
Asn		Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, Thr, Lys	His, Arg, Tyr, Gly, Ala, Trp, Pro
Gln		Lys, Asn, Arg, Glu, Asp, Gln	Pro, His, Met, Tyr, Ala, Gly, Ser, Thr
Val	HA2 -- 52	Val, Leu, Ile, Phe	Cys, Met, Trp, Tyr, Ala, Gly, Thr, Pro
Leu		Met, Cys, Phe, Ile, Leu, Val, Tyr	His, Trp, Gly, Ala, Ser, Asp, Pro
Ile		Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp, Cys	Tyr, Pro, Ala, Thr
Asp	HA2 -- 53	Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, Thr, Lys	His, Arg, Tyr, Gly, Ala, Trp, Pro
Ile	HA2 -- 56	Ile, Met, Phe, Leu, Val, Trp, Cys	Tyr, Pro, Ala, Thr
Val		Val, Leu, Ile, Phe	Cys, Met, Trp, Tyr, Ala, Gly, Thr, Pro

FIG. 13

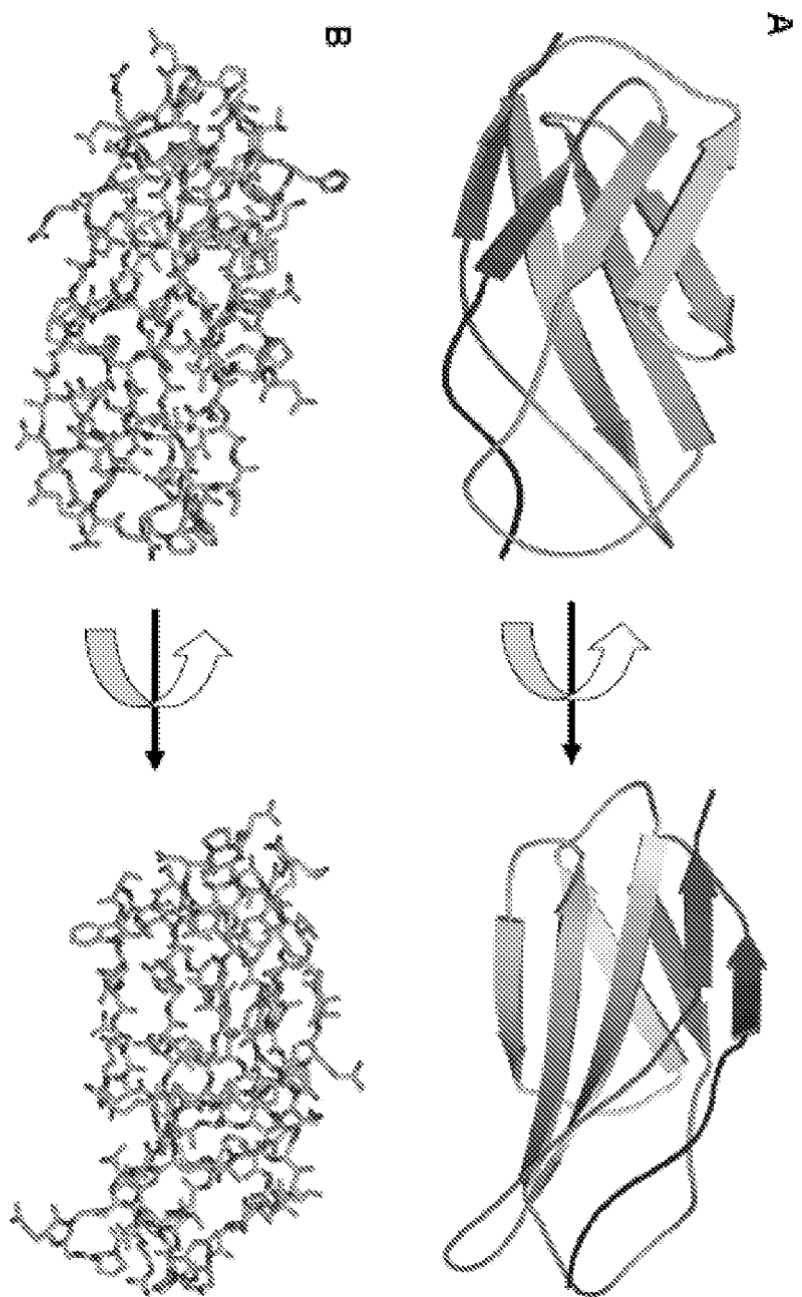


FIG. 14

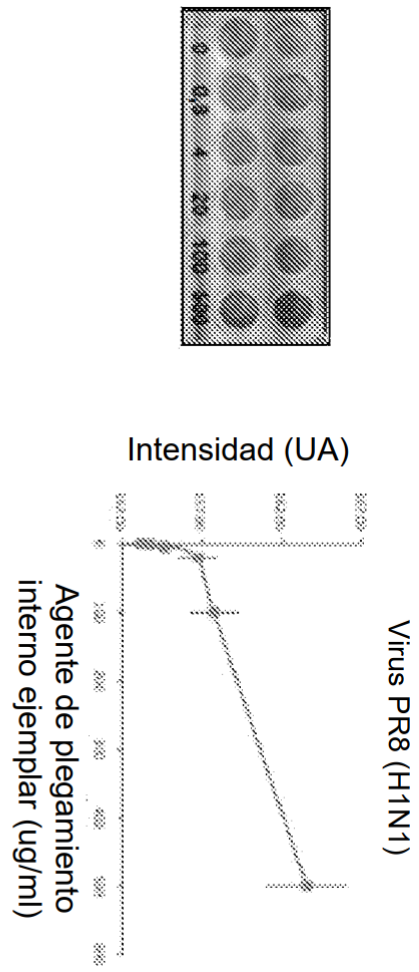


FIG. 15

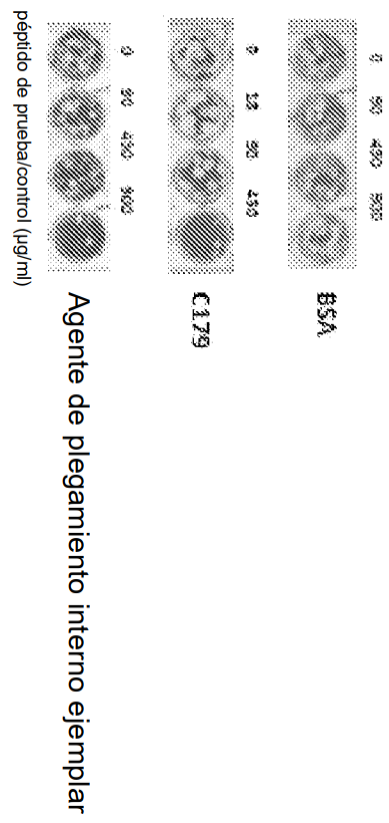


FIG. 16

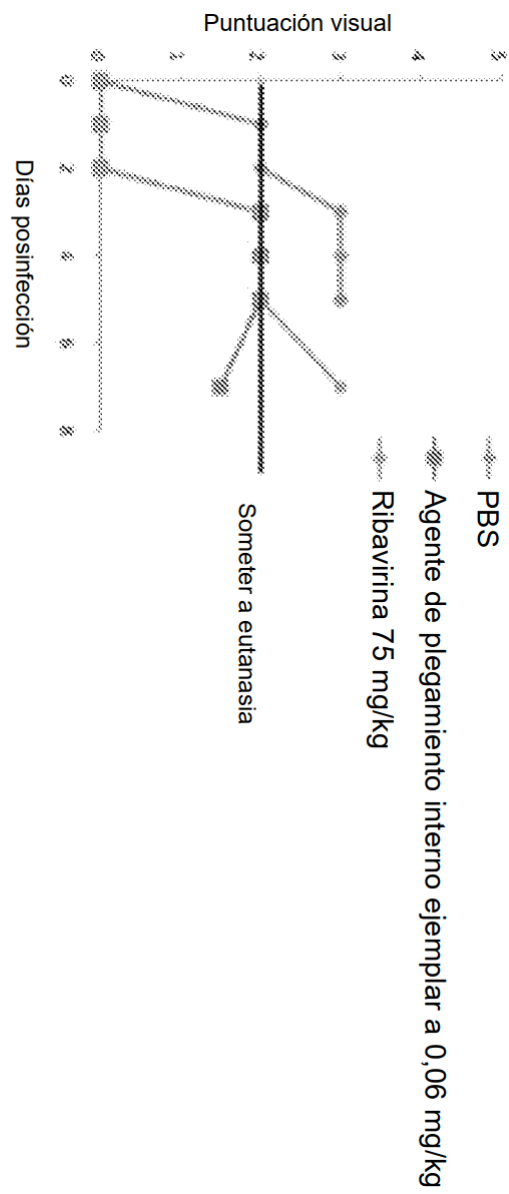


FIG. 17

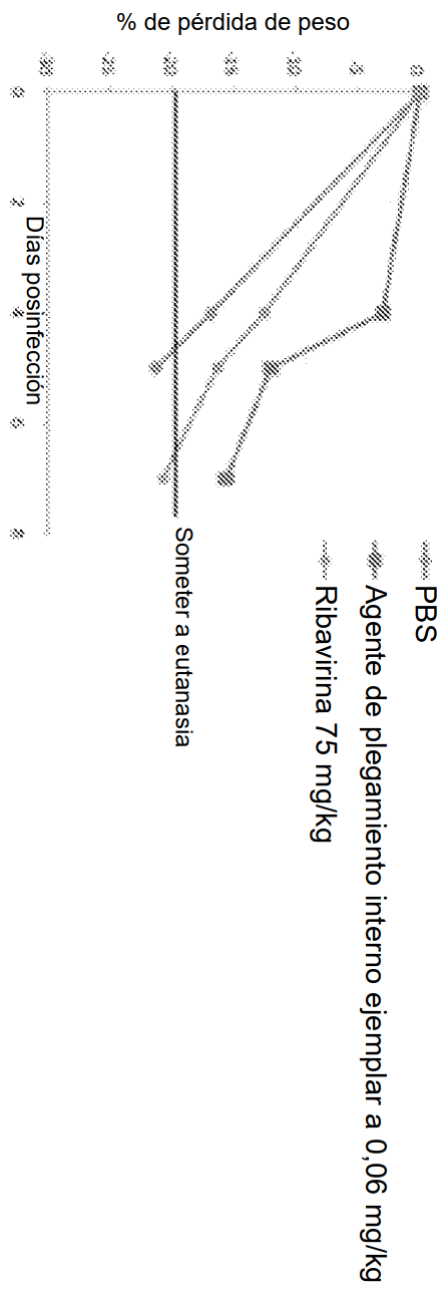


FIG. 18

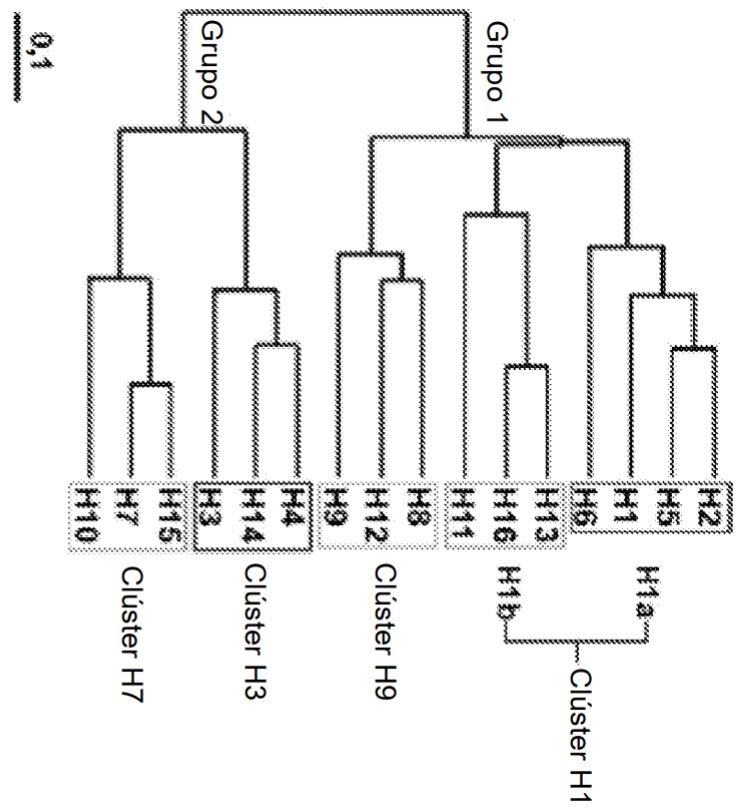


FIG. 19

**Concentración de Plegamiento interno 28
en la premezcla (µg/ml)**

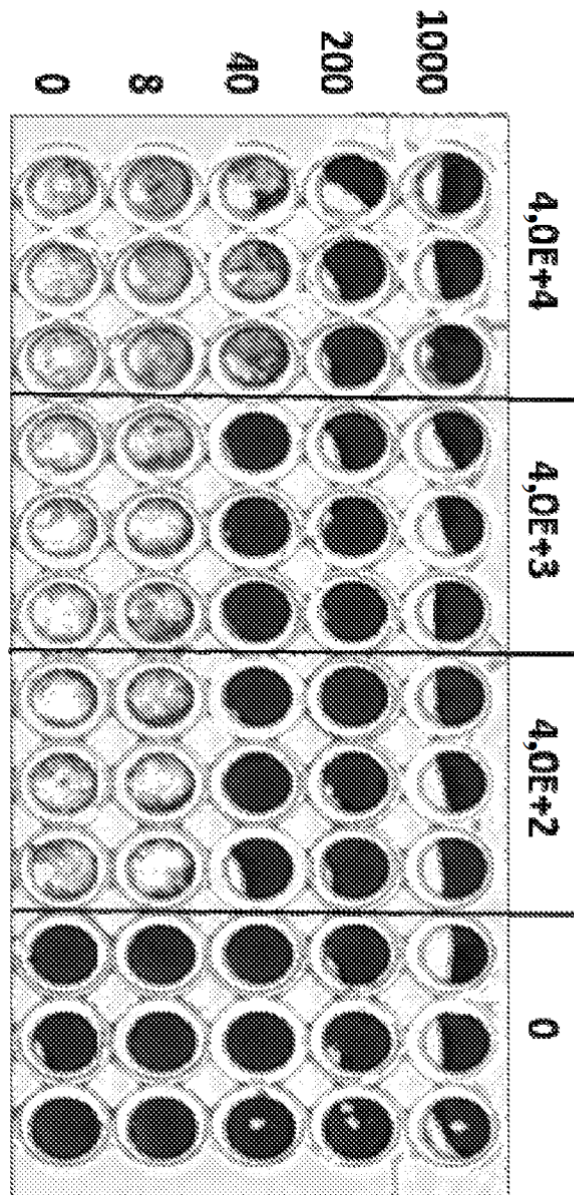
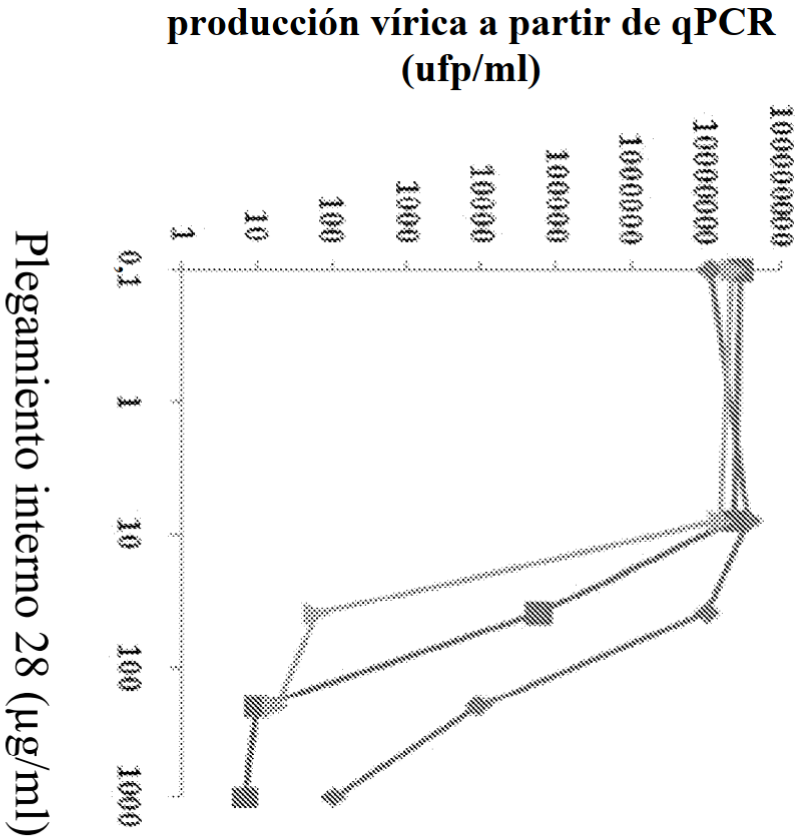


FIG. 20



Siembra de PR8		Plegamiento 28 interno
Título (ufp/ml)	m.o.i	CI50 (µg/ml)
4.00E+04	4.00	25
4.00E+03	0.40	13
4.00E+02	0.04	11

FIG. 21

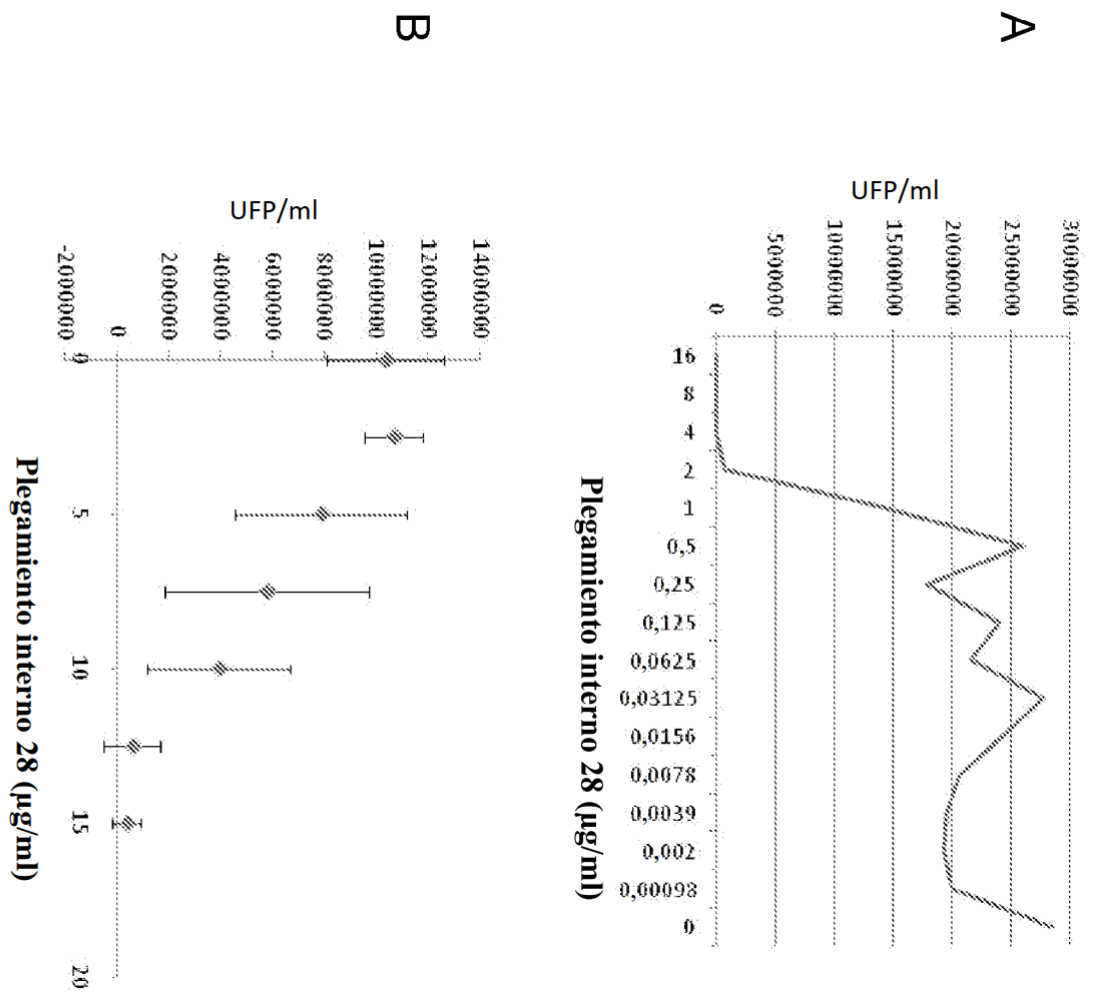


FIG. 22