

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 243**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2019 PCT/EP2019/051532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019 WO19145310**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2019 E 19701815 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2022 EP 3743106**

54 Título: **Vacunas contra virus de la gripe y usos de las mismas**

30 Prioridad:

23.01.2018 EP 18152991

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

24.10.2022

73 Titular/es:

**JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**MILDER, FERDINAND, JACOBUS;
RITSCHER, TINA;
BRANDENBURG, BOERRIES;
JONGENEELLEN, MANDY, ANTONIA,
CATHARINA;
TRUAN, DAPHNÉ y
LANGEDIJK, JOHANNES, PETRUS, MARIA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 926 243 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra virus de la gripe y usos de las mismas

INTRODUCCIÓN

5 La invención se refiere al campo de la medicina. En el presente documento se proporcionan polipéptidos de dominio de tallo de la hemaglutinina (HA) de la gripe A, ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, composiciones farmacéuticas que los comprenden y métodos de su uso. Las referencias a los métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas, vacunas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo animal mediante terapia.

10 ANTECEDENTES

Los virus de la gripe son patógenos humanos importantes, que provocan una enfermedad respiratoria (denominada habitualmente "influenza" o "gripe") cuya gravedad varía desde infección subclínica hasta neumonía vírica primaria que puede provocar la muerte. Los efectos clínicos de la infección varían con la virulencia de la cepa de gripe y la exposición, el historial, la edad y el estado inmunitario del hospedador. Cada año se estima que aproximadamente mil millones de personas en todo el mundo padecen infección con virus de la gripe, lo que conduce a una enfermedad grave en 3-5 millones de casos y una estimación de 300,000 a 500,000 muertes relacionadas con la gripe. La gran mayoría de estas infecciones pueden atribuirse a virus de la gripe A que portan subtipos de hemaglutinina H1 o H3, con una contribución menor de los virus de la gripe B, y por los tanto se incluyen normalmente representantes de estos en la vacuna estacional. La práctica de inmunización actual depende de una identificación temprana de los virus de la gripe en circulación para permitir una producción a tiempo de una vacuna contra la gripe estacional eficaz. Aparte de las dificultades inherentes en la predicción de las cepas que serán dominantes durante la siguiente estación, la resistencia a antivíricos y el escape inmunitario también desempeñan un papel en el fracaso de las vacunas actuales en la prevención de la morbilidad y mortalidad. Además, la posibilidad de una pandemia provocada por una cepa vírica muy virulenta que se origina en reservorios animales y se reorganiza para aumentar la propagación entre seres humanos, aún representa una amenaza significativa y real para la salud global.

Los virus de la gripe son virus de ARN con envoltura que pertenecen a la familia de *Orthomyxoviridae*. Sus genomas consisten en ocho segmentos de ARN monocatenarios que codifican 11 proteínas diferentes, una nucleoproteína (NP), tres proteínas de polimerasa (PA, PB1 y PB2), dos proteínas de matriz (M1 y M2), tres proteínas no estructurales (NS1, NS2 y PB1-F2) y dos glucoproteínas externas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

30 Los virus de la gripe A están distribuidos ampliamente en la naturaleza y pueden infectar a diversas aves y mamíferos. Los virus se clasifican basándose en diferencias en la estructura antigénica de las proteínas HA y NA, representando sus diferentes combinaciones subtipos de virus únicos que se clasifican adicionalmente en cepas de virus de la gripe específicas. Aunque todos los subtipos conocidos pueden encontrarse en aves, los subtipos de gripe A humana actualmente en circulación son H1N1 y H3N2. El análisis filogenético de virus de la gripe A ha demostrado una subdivisión de hemaglutininas en dos grupos denominados filogenéticos principales: entre otros, los subtipos H1, H2, H5 y H9 en el grupo filogenético 1 (los virus del grupo 1) y, entre otros, los subtipos H3, H4 y H7 en el grupo filogenético 2 (virus del grupo 2).

40 Las cepas de virus de la gripe de tipo B son estrictamente humanas. La variación antigénica en HA dentro de las cepas de virus de la gripe de tipo B es menor que la observada dentro de las cepas de tipo A. Dos linajes genética y antigénicamente distintos de virus de la gripe B están en circulación en seres humanos, como se representa mediante los linajes B/Yamagata/16/88 (también denominado B/Yamagata) y B/Victoria/2/87 (B/Victoria). Aunque el espectro de enfermedades provocadas por virus de la gripe B es en general más leve que el provocado por virus de la gripe A, aún se observan con frecuencia enfermedades graves que requieren hospitalización con infección por gripe B.

45 Se sabe que los anticuerpos que neutralizan el virus de la gripe están dirigidos principalmente contra hemaglutinina (HA). La hemaglutinina o HA es una glucoproteína trimérica que está anclada en la membrana vírica y tiene una función doble: es responsable de la unión al receptor de superficie celular de ácido siálico y, tras la captación, media en la fusión de la membrana vírica y endosómica lo que conduce a la liberación de ARN vírico en el citosol de la célula. HA comprende un dominio de cabeza grande y un dominio de tallo más pequeño. El dominio de tallo se ancla a la membrana vírica a través de una secuencia de dominio transmembrana C-terminal. La proteína se escinde de manera postraduccional para producir dos polipéptidos de HA, HA1 y HA2 (la secuencia completa se denomina HA0) (Fig. 1A). La región de cabeza distal de membrana procede principalmente de HA1 y la región de tallo proximal de membrana principalmente de HA2. La escisión de la molécula precursora de HA HA0 es necesaria para activar la infecciosidad del virus y la distribución de proteasas activadoras en el hospedador es uno de los determinantes de patogenicidad del virus de la gripe. Las HA de virus de mamíferos y aviares no patógenos se escinden extracelularmente, lo que limita su propagación en los hospedadores a tejidos donde se encuentran las proteasas adecuadas. Por otro lado, las HA de virus patógenos se escinden intracelularmente mediante proteasas de aparición ubicua y, por lo tanto, tienen la capacidad de infectar diversos tipos celulares y provocar infecciones sistémicas.

La razón de que la vacuna contra la gripe estacional deba actualizarse cada año es la gran variabilidad de los virus. En la proteína de HA esta variación se manifiesta en particular en el dominio de cabeza donde la deriva y el desplazamiento antigénicos han dado lugar a un gran número de variantes diferentes. Ya que esta también es el área que es inmunodominante, la mayoría de anticuerpos neutralizantes se dirigen a este dominio y actúan interfiriendo con la unión al receptor. La combinación de inmunodominancia y gran variación del dominio de cabeza explica por qué la infección con una cepa particular no conduce a la inmunidad frente a otras cepas: los anticuerpos inducidos por la primera infección solo reconocen un número limitado de cepas estrechamente relacionadas con el virus de la infección primaria.

Recientemente, se han descrito polipéptidos de tallo de hemaglutinina de la gripe, que carecen del dominio completo de cabeza globular de hemaglutinina de la gripe, y se han usado para generar una respuesta inmunitaria frente a uno o más epítomos conservados del polipéptido de dominio de tallo. Se cree que los epítomos del polipéptido de tallo son menos inmunogénicos que las regiones muy inmunogénicas de un dominio de cabeza globular y que la ausencia de un dominio de cabeza globular en el polipéptido de tallo podría permitir que se desarrolle una respuesta inmunitaria frente a uno o más epítomos del polipéptido de tallo (Steel *et al.*, 2010). Steel *et al.* crearon de este modo un polipéptido de tallo de HA de la gripe suprimiendo los restos de aminoácidos de 53 a 276 del dominio HA1 de las cepas A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) y A/Hong Kong/1968 (H3N2) y reemplazando la secuencia suprimida por una secuencia de conexión flexible corta GGGG. La vacunación de ratones con la construcción de H3 HK68 no indujo antisueros que tuvieran reactividad cruzada con las HA del grupo 1. Además, como se muestra en el documento WO2013/079473, los polipéptidos de tallo eran inestables y no adoptaban la conformación correcta como se demuestra por la ausencia de unión de anticuerpos que se mostró que se unían a epítomos conservados en la región de tallo.

Bommakanti *et al.* (2010) describieron un polipéptido basado en HA2 que comprende los restos de aminoácidos 330-501 (HA2), un conector de 7 aminoácidos (GSAGSAG), los restos de aminoácidos 16-55 de HA1, un conector de 6 aminoácidos GSAGSA, seguido de los restos 290-321 de HA1, con las mutaciones V297T, I300E, Y302T y C305T en HA1. El diseño se basó en la secuencia de H3 HA (A/Hong Kong/1968). El polipéptido solo proporcionó protección cruzada frente a otra cepa de virus de la gripe dentro del subtipo H3 (A/Phil/2/82 pero no frente a un subtipo H1 (A/PR/8/34). En un documento más reciente por Bommakanti *et al.* (2012) se describe un polipéptido de tallo basado en HA de H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (H1HA0HA6). En este polipéptido, se ha suprimido el equivalente de los restos de aminoácidos 48 a 288 y se han producido las mutaciones I297T, V300T, I302N, C305S, F392D, F395T y L402D. Los polipéptidos basados tanto en H3 como en H1 se expresaron en *E. coli* y, por lo tanto, carecen de los glucanos que son parte de las proteínas HA de origen natural.

Más recientemente, Lu *et al.* (2014) también describieron polipéptidos de tallo solubles derivados de la HA de H1N1 A/California/05/2009. En el diseño final, se suprimieron los restos de aminoácidos 52 a 277 (la secuencia líder tampoco está presente) y se introdujeron dos mutaciones en el bucle B de la proteína, es decir F392D y L402D. Asimismo, el polipéptido contenía un dominio de trimerización C-terminal (dominio de plegamiento). Además, se introdujeron dos enlaces disulfuro entre monómeros, uno en el área del dominio de plegamiento trimérico y uno en la posición 416 y 417 (es decir, G416C y F417C en la numeración de H3). El polipéptido se produjo en un sistema sin células basado en *E. coli*, (y, por tanto, carece de los glucanos que son parte de las proteínas HA de origen natural) y se recuperó en forma desnaturalizada, que necesita replegarse antes de su uso. La proteína replegada no consiguió unirse al anticuerpo ampliamente neutralizante (bnAb) CR6261 que se une a un epítomo de tallo conformacional conservado. No se mostró ningún dato inmunológico o de protección a partir de la exposición a gripe.

En otro documento, Mallajosyula *et al.* (2014) también describieron un polipéptido de tallo de HA de la gripe. En este diseño, basándose en la HA de H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 no solo se suprimió una gran parte de la secuencia de HA1 (restos 48 a 289, numeración de H3), sino también gran parte de las secuencias N- y C-terminales de HA2 (restos 323 a 369 y 443 hasta el final, respectivamente). El polipéptido contenía un dominio de trimerización de plegamiento en el extremo C y también se produjo en *E. coli*, de modo que carece de los glucanos de origen natural en la HA vírica. Se mostró que el polipéptido se unía a los bnAb CR6261, F10 y FI6v3, y protegía a los ratones de una exposición a virus de la gripe letal (1LD90 de H1N1 A/Puerto Rico/8/1934). Los polipéptidos equivalentes derivados de HA de H1N1 A/New Caledonia/20/1999 y H1N1 A/California/04/2009 también podrían proteger parcialmente. Un polipéptido derivado de H5N1 A/Vietnam/1203/2004 solo proporcionó protección limitada en este modelo de exposición. Por otro lado, el modelo de exposición usado fue leve con una dosis administrada relativamente baja (1-2 LD90).

Por último, Yassine *et al.* (2015) también describieron el desarrollo de un polipéptido de tallo de HA estabilizado derivado de HA de H1N1 A/New Caledonia/20/1999. En este diseño, se ha suprimido una gran parte de la secuencia de HA1 (restos 43 a 313, numeración de H3) y la secuencia de HA2 (restos 504 hasta el final). Además, el diseño contiene dos mutaciones estabilizantes (K380M y E432L) en HA2 y se fusiona genéticamente con la subunidad de ferritina de *H. pylori* para crear nanopartículas de autoensamblaje que presentan el polipéptido de tallo de HA estabilizado. El polipéptido de tallo de HA estabilizado no parecía ser soluble ni funcional sin fusionarse con la subunidad de ferritina. El polipéptido de ferritina de tallo de HA ensamblado con nanopartículas se analizó en un modelo de exposición a virus de la gripe H5N1 2004 VN (25 x DL₅₀ y 1,000 x DICT₅₀ en ratón y hurón, respectivamente) y pudo proteger a los ratones de la muerte, mientras que solo se observó protección parcial en hurones. No está claro cuánta respuesta a ferritina se induciría en seres humanos y qué efecto tendría eso para múltiples administraciones.

Por tanto todavía existe la necesidad de una vacuna "universal" segura y eficaz que estimule la producción de una respuesta robusta de anticuerpos ampliamente neutralizantes y que ofrezca protección frente a un amplio conjunto de

cepas de virus de la gripe actuales y futuras (tanto estacionales como pandémicas), en particular una vacuna que proporcione protección frente a uno o más subtipos de virus de la gripe A dentro del grupo filogenético 1 y/o grupo filogenético 2, para la prevención y/o el tratamiento eficaz de la gripe.

SUMARIO

5 La presente invención proporciona péptidos novedosos derivados de hemaglutinina de la gripe (HA), polipéptidos que comprenden el dominio de tallo de HA de la gripe y carecen de la región de cabeza globular, denominados en el presente documento polipéptidos de tallo de hemaglutinina de la gripe (HA). Los polipéptidos inducen una respuesta inmunitaria frente a HA cuando se administran a un sujeto, en particular un sujeto humano. Los polipéptidos de la invención presentan epítomos conservados del tallo proximal de membrana de la molécula de HA al sistema inmunitario en ausencia de epítomos dominantes que están presentes en el dominio de cabeza distal de membrana. Por tanto, se ha suprimido parte de la secuencia primaria de la proteína HA0, es decir, la parte que compone el dominio de cabeza, y se ha vuelto a conectar la secuencia de aminoácidos restante bien directamente o bien, en algunas realizaciones, introduciendo una secuencia de conexión flexible corta ('conector') para restaurar la continuidad de la cadena de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos resultante se modifica adicionalmente introduciendo modificaciones específicas que estabilizan la estructura tridimensional nativa de la parte restante de la molécula de HA.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos de tallo de hemaglutinina (HA) de la gripe A de grupo 1 que comprende un dominio HA1 y uno HA2, comprendiendo dichos polipéptidos una secuencia de aminoácidos que comprende, en comparación con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HA de longitud completa que comprende un dominio HA1 y uno HA2:

- 20 (i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1;
 - (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación en la hélice C,
 - (iii) al menos 2 restos de cisteína que forman (son capaces de formar) un enlace disulfuro intramonomérico;
 - (iv) al menos 2 restos de cisteína que forman (son capaces de formar) un enlace disulfuro intermonomérico;
- 25 en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 434 es Q, y en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3 como se usa en Winter *et al.* (1981).

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a polipéptidos de tallo de hemaglutinina (HA) de la gripe A de grupo 1 que comprende un dominio HA1 y uno HA2, en donde dichos polipéptidos de tallo de HA comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende, en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de HA de longitud completa (HA0) que comprende un dominio HA1 y uno HA2:

- 30 (i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1, comprendiendo dicha supresión al menos la secuencia de aminoácidos del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 302;
 - 35 (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación de la región de trimerización en la hélice C, comprendiendo dicha región de trimerización la secuencia de aminoácidos del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 419;
 - (iii) una cisteína en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 310 y una cisteína en la posición correspondiente a la posición 422 que forma (capaz de formar) un enlace disulfuro intramonomérico;
 - 40 (iv) una cisteína en la posición correspondiente a la posición 397 en combinación con una cisteína en la posición correspondiente a la posición 405; o una cisteína en la posición correspondiente a la posición 396 en combinación con una cisteína en la posición correspondiente a la posición 408; o una cisteína en la posición correspondiente a la posición 399 en combinación con una cisteína en la posición 405;
- 45 en donde el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y en donde el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 434 es Q; y en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3 como se usa en Winter *et al.* (1981).

Según la presente invención, se ha mostrado sorprendentemente que los polipéptidos novedosos de tallo de HA de la gripe de la invención pueden expresarse en altos niveles, son mayoritariamente triméricos en el sobrenadante de cultivo celular y tienen una temperatura de fusión aumentada que conduce a mayor estabilidad. Además, los polipéptidos de tallo de HA de la invención se asemejan al tallo de la HA de longitud completa al presentar de manera estable el epítomo de bNAbs que se unen a tallo de HA, tales como CR9114 y/o CR6261.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos de tallo de HA de la gripe.

En otro aspecto más, la invención proporciona vectores, en particular vectores adenovíricos, que comprenden los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de tallo de HA de la gripe.

- 5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido de tallo de HA de la gripe, una molécula de ácido nucleico, y/o un vector para su uso para inducir una respuesta inmunitaria mediante la administración contra la HA de la gripe en un sujeto que lo necesita.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de tallo de HA de la gripe, una molécula de ácido nucleico y/o un vector según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 En un aspecto adicional, la invención proporciona polipéptidos de tallo de HA de la gripe, moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos de tallo de HA de la gripe y/o vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico para su uso como un medicamento, en particular para su uso como una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o afección provocada por una cepa de virus de la gripe A del grupo filogenético 1 y/o 2 y/o una cepa de virus de la gripe B.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. A. Descripción esquemática de los polipéptidos de la invención; B. La eliminación de la región de cabeza de HA da lugar a los polipéptidos de tallo de la invención (mini-HA); C. Representación tridimensional de un polipéptido basado en tallo de la invención.

Figura 2. Dibujo esquemático de la construcción parental 5367 basada en A/Brisbane.

- 20 Figura 3. Dibujo esquemático de la construcción parental 5369 basada en A/Brisbane.

Figura 4. Dibujo esquemático de una realización de un polipéptido de la invención, que muestra la nueva mutación del aminoácido en la posición 392 en el bucle B a P o R, una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q y una mutación en la posición 442 a A, y que comprende además una mutación del aminoácido en la posición 404 a Q.

Figura 5. Niveles de expresión y contenido de trímeros de varios polipéptidos de la

- 25 invención (gris) y los diseños parentales (negro). A: Niveles de expresión de proteínas según lo determinado por OCTET (CR9114); B y C: Contenido de trímeros según lo determinado por AlphaLISA (los valores se expresan en % en relación con el polipéptido UFV160656 que está ajustado al 100 %; el valor para el polipéptido 5367 es una estimación basada en transferencia de Western). El experimento se realizó múltiples veces y estos datos son representativos de los valores observados. Las mutaciones estabilizadoras se muestran en los paneles de la izquierda.

- 30 Figura 6. Las fracciones de elución de cromatografía de afinidad agrupadas separadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño; se indican los agregados, trímeros y monómeros (panel A y B). El análisis por SEC-MALS de la fracción de trímeros agrupada indica que el polipéptido de la invención es muy puro y homogéneo en su masa molar (panel C).

- 35 Figura 7. Perfiles de SEC del polipéptido de tallo trimérico de la invención y fragmentos Fab. La superposición muestra los cromatogramas del polipéptido (negro), del fragmento Fab (discontinuo) y de la muestra que contienen ambos (gris). Se presentan los resultados para el polipéptido 160656. Los picos solapantes en el panel A indican que el Fab usado como control negativo no se une con el polipéptido, mientras que los polipéptidos preincubados con Fab6261 (panel B) y Fab9114 (panel C) presentan un desplazamiento de picos (tiempo de retención reducido) lo que indica formación de complejo (un trímero con el que se unen tres fragmentos Fab).

- 40 Figura 8. Representación esquemática de la eliminación del dominio de cabeza de HA (HA1). En el diseño parental, se elimina el dominio de cabeza y los dos extremos de HA1 se conectan mediante un "conector GGGG" artificial (panel izquierdo). En los polipéptidos de la invención los extremos se conectan directamente (posición de corte alternativa) o por medio de una secuencia conectora homóloga que se origina del dominio de cabeza.

- 45 Figura 9. Niveles de expresión, unión a anticuerpo y contenido de trímeros de los polipéptidos de la invención según lo determinado por AlphaLISA. A: niveles de expresión, B: unión a CR9114 y C: Contenido de trímeros. Los diseños que incluyen los cortes alternativos están coloreados en gris (panel izquierdo), los diseños que incluyen conectores alternativos están coloreados en gris claro. Todos los datos se normalizan con respecto al diseño de referencia UFV160360 (negro).

- 50 Figura 10. Niveles de expresión y trimerización de polipéptidos de la invención. Los niveles de expresión se determinaron mediante OCTET (panel A) y el contenido de trímeros mediante AlphaLISA (panel B). Los datos se normalizan con respecto al polipéptido de referencia UFV150850.

Figura 11. Niveles de expresión normalizados, contenido de trímeros y unión a CR9114. Se analizaron los sobrenadantes de cultivo mediante AlphaLISA. La construcción de referencia UFV160097 contiene la repetición de

héptada de tipo GCN4 y se indica en negro, mientras que el polipéptido que contiene la repetición de héptada alternativa está coloreada en gris. Los niveles de unión a CR9114 se normalizaron mediante el nivel de expresión determinado.

Figura 12. Expresión y unión de anticuerpo a variantes polipeptídicas con truncamientos C-terminales alternativos. A: Transferencia de Western que usa un anticuerpo de un único dominio específico de HA. Casi todas las muestras presentan una banda clara a la altura trimérica que es similar a ambos polipéptidos de referencia (UFV5367 y UFV5369). B: La unión de polipéptidos con el anticuerpo ampliamente neutralizante CR9114 según lo determinado por OCTET, se muestran valores de K_{on} relativos de los polipéptidos en comparación con el diseño de referencia UFV5367 y UFV5369.

Figura 13. Nivel de expresión normalizado, contenido de trímeros y unión a CR9114. Se analizaron los sobrenadantes de cultivo mediante AlphaLISA. La construcción de referencia UFV160090 se indica en negro, mientras que el polipéptido que contiene cisteínas introducidas en posiciones alternativas esta coloreado en gris. El contenido de trímeros y los niveles de unión a CR9114 se normalizaron en función del nivel de expresión determinado.

Figura 14: Numeración de las posiciones de aminoácidos en H1 A/California/07/09 y en UFV160664, según la numeración de H3 de Winter *et al.* (1981).

Figura 15: Títulos de anticuerpos específicos de HA H1 A/Brisbane/59/07 FL después de inmunización de ratones con polipéptidos de la invención. La línea discontinua indica el LIDC (límite inferior de cuantificación), la línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 16: Panel superior: Proporción de supervivencia durante el periodo de seguimiento después de la exposición a H1N1 A/Brisbane/59/07 de ratones inmunizados con polipéptidos de la invención. Panel inferior: Peso corporal relativo durante el periodo de seguimiento después de la exposición a H1N1 A/Brisbane/59/07 de ratones inmunizados con polipéptidos de la invención. El cambio de peso corporal relativo se expresó en relación con el día 0. La pérdida de peso corporal acumulada durante el periodo de seguimiento se determinó calculando el área bajo la curva (ABC). Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95 %.

Figura 17: Panel superior: Proporción de supervivencia durante el periodo de seguimiento después de la exposición a H1N1 A/Puerto Rico/8/34 de ratones inmunizados con polipéptidos de la invención. Panel inferior: Peso corporal relativo durante el periodo de seguimiento después de la exposición a H1N1 A/Puerto Rico/8/34 de ratones inmunizados con polipéptidos de la invención. El cambio de peso corporal relativo se expresó en relación con el día 0. La pérdida de peso corporal acumulada durante el periodo de seguimiento se determinó calculando el área bajo la curva (ABC). Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95 %.

Figura 18: Títulos de anticuerpos específicos de HA H1 A/California/07/09 FL después de inmunización de hurones con polipéptidos de la invención. Comparación estadística de diferentes dosis de polipéptido de la invención y SOC con el grupo solo con adyuvante usando ANOVA censurado con prueba de la *t a posteriori*, comenzando a la dosis mayor y ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones. Las líneas discontinuas indican el LSDC (límite superior de cuantificación) y el LIDC. La línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 19: Títulos de anticuerpos específicos de tallo de HA H1 A/California/07/09 FL después de inmunización de hurones con polipéptidos de la invención. Comparación estadística de diferentes dosis de polipéptido de la invención y SOC con el grupo solo con adyuvante usando ANOVA censurado con prueba de la *t a posteriori*, comenzando a la dosis mayor y ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones. La línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 20: Títulos de cargas víricas del pulmón al final del periodo de seguimiento (día 4 después de la exposición) después de inmunización de hurones con polipéptidos de la invención seguido de exposición con H1N1 A/NL/602/09. La línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo, los símbolos en blanco indican muestras en el límite de detección (LDD).

Figura 21: Supervivencia durante el periodo de seguimiento de 5 días de hurones inmunizados con polipéptidos de las invenciones, H5 FL HA (control de exposición positivo) y solamente adyuvante (control de exposición negativo), seguido de exposición con H5N1 A/Indonesia/05/05.

Figura 22: Pérdida de peso corporal acumulada (ABC) de animales individuales, obtenida de mediciones de peso corporal diarias consecutivas durante el periodo de seguimiento (día 0 a 5), en relación con el peso corporal el día 0 después de la inmunización de hurones con polipéptidos de la invención seguido de exposición con H5N1 A/Indonesia/05/05. La línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 23: Títulos de cargas víricas del pulmón al final del periodo de seguimiento (día 5 después de la exposición) después de inmunización de hurones con polipéptidos de la invención seguido de exposición con H5N1 A/Indonesia/05/05. La línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo, los símbolos en blanco indican muestras en el límite de detección (LDD).

Figura 24: Carga vírica en la garganta acumulada (ABC), obtenida de mediciones de frotis de la garganta diarios consecutivos durante el periodo de seguimiento (día 0 a 5), en relación con el peso corporal el día 0 después de la

inmunización de hurones con polipéptidos de la invención seguido de exposición con H5N1 A/Indonesia/05/05. La línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 25: Títulos de anticuerpos específicos de HA H1 A/California/07/09 FL después de inmunización de ratones con polipéptidos de la invención. La línea discontinua indica el LIDC (límite inferior de cuantificación), los símbolos en blanco representan muestras en el LIDC, la línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 26: Títulos de anticuerpos específicos de tallo de HA H1 A/California/07/09 FL después de inmunización de ratones con polipéptidos de la invención. La línea discontinua indica el LIDC (límite inferior de cuantificación), los símbolos en blanco representan muestras en el LIDC, la línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 27: Linfocitos T productores de IFN- γ por millón de esplénocitos de ratones inmunizados, después de estimulación *in vitro* con péptidos UFV160664. La línea discontinua indica el LIDC (límite inferior de cuantificación), los símbolos en blanco representan muestras en el LIDC, la línea horizontal por grupo indica la mediana del grupo.

Figura 28: Caracterización *in vitro* de sobrenadantes de cultivo de polipéptidos de tallo trimérico expresados en EXPI-CHO procedentes de diferentes cepas de gripe del grupo 1 en donde las mutaciones de la construcción UFV160664 se transfirieron.

A. Niveles de expresión de proteínas según lo determinado por OCTET (anti-His2); B. Perfiles de SEC, trímero y pico monomérico indicados respectivamente con 'T' y 'M'; C. Curvas de unión de los polipéptidos con los mAb CR9114 y MD3606 según lo determinado mediante AlphaLISA. Las mutaciones del polipéptido de tallo trimérico de la invención en la cepa A/California/07/09) son transferibles a otras cadenas principales de grupo 1; se expresa mini-HA trimérico y se observa la unión de anticuerpo específico de tallo CR9114 y MD3606 multidominio.

DEFINICIONES

Se proporcionan a continuación definiciones de términos como se usan en la presente invención.

Un aminoácido según la invención puede ser cualquiera de los veinte de origen natural (o aminoácidos "convencionales") o variantes de los mismos, tales como, p. ej., D-prolina (el enantiómero D de prolina) o cualquier variante que no se encuentre de manera natural en las proteínas, tales como, p. ej., norleucina. Los aminoácidos convencionales pueden dividirse en varios grupos basándose en sus propiedades. Son factores importantes la carga, hidrofilia o hidrofobicidad, tamaño y grupos funcionales. Estas propiedades son importantes para la estructura proteica e interacciones entre proteínas. Algunos aminoácidos presentan propiedades especiales, como es el caso de la cisteína, que puede formar enlaces covalentes disulfuro (o puentes disulfuro) con otros restos de cisteína, prolina, que forma un ciclo con la cadena principal polipeptídica, y glicina, que es más flexible que otros aminoácidos. La tabla 12 muestra las abreviaturas y propiedades de los aminoácidos convencionales.

Se considera que la expresión "incluido" o "que incluye" como se usa en el presente documento está seguida de las palabras "sin limitación".

Como se usa en el presente documento, el término "infección" significa la invasión por, multiplicación y/o presencia de un virus en una célula o un sujeto. En una realización, una infección es una infección "activa", es decir, una en la que el virus se está replicando en una célula o un sujeto. Una infección de este tipo se caracteriza por la propagación del virus a otras células, tejidos y/u órganos, desde las células, tejidos y/u órganos infectados inicialmente por el virus. Una infección puede ser también una infección latente, es decir, una en la que el virus no se está replicando. En determinadas realizaciones, una infección se refiere al estado patológico que resulta de la presencia del virus en una célula o un sujeto o por la invasión de una célula o un sujeto por el virus.

Los virus de la gripe se clasifican habitualmente en tipos de virus de la gripe: géneros A, B y C. La expresión "subtipo de virus de la gripe" como se usa en el presente documento se refiere a variantes de virus de la gripe A que se caracterizan por combinaciones de las proteínas de la superficie vírica hemaglutinina (H) y neuramidasa (N). Según la presente invención, puede hacerse referencia a los subtipos de virus de la gripe por su número H, tal como por ejemplo "virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3", "virus de la gripe del subtipo H3" o "gripe H3" o por una combinación de un número H y un número N, tal como, por ejemplo, "subtipo de virus de la gripe H3N2" o "H3N2". El término "subtipo" incluye específicamente todas las "cepas" individuales, dentro de cada subtipo, que resultan habitualmente de mutaciones y muestran diferentes perfiles patógenos, incluyendo aislados naturales así como mutantes o virus reagrupados artificiales y similares. También puede hacerse referencia a dichas cepas como diversos "aislados" de un subtipo vírico. Por consiguiente, como se usa en el presente documento, los términos "cepas" y "aislados" pueden usarse indistintamente. La nomenclatura actual para cepas de virus de la gripe humano o aislados incluye el tipo (género) de virus, es decir A, B o C, la ubicación geográfica del primer aislamiento, número de cepa y año de aislamiento, habitualmente con la descripción antigénica de HA y NA proporcionada entre paréntesis, p. ej. A/Moscow/10/00 (H3N2). Las cepas no humanas también incluyen el hospedador de origen en la nomenclatura.

Los subtipos de virus de la gripe A pueden clasificarse además mediante referencia a su grupo filogenético. El análisis filogenético ha demostrado una subdivisión de hemaglutininas en dos grupos principales: entre otros, los subtipos H1, H2,

H5 y H9 en el grupo filogenético 1 (virus de la gripe del "grupo 1") y, entre otros, los subtipos H3, H4, H7 y H10 en el grupo filogenético 2 (virus de la gripe del "grupo 2").

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad por virus de la gripe" se refiere a la afección patológica resultante de la presencia de un virus de la gripe, p. ej., un virus de la gripe A o B, en un sujeto. Como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad" y "trastorno" se usan indistintamente. En realizaciones específicas, el término se refiere a una enfermedad respiratoria provocada por la infección del sujeto por el virus de la gripe.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "ácido nucleico" incluye moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse de forma química o bioquímica o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como enlaces sin carga (p. ej., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces con carga (p. ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (p. ej., polipéptidos), intercaladores (p. ej., acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Una referencia a una secuencia de ácido nucleico abarca su complemento a menos que se especifique de otro modo. Por tanto, debe entenderse que una referencia a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia particular abarca su hebra complementaria, con su secuencia complementaria. La hebra complementaria también es útil, p. ej., para terapia antisentido, sondas de hibridación y cebadores de PCR.

Como se usa en el presente documento, la numeración de los aminoácidos en HA se basa en la numeración de H3, como se describe en Winter *et al.* (1981). La numeración de los restos de aminoácidos o las posiciones de aminoácidos se refiere por tanto a la numeración en el H3 HA de longitud completa (en particular, la numeración de las posiciones de aminoácidos en A/Aichi/2/68), como se describe y se muestra en la figura 2 en Winter *et al.* (1981). La numeración en particular se refiere a la numeración de las posiciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 15. Por ejemplo, la expresión "el aminoácido en la posición 392" o "el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 392" (que se usan indistintamente a lo largo de la presente solicitud) se refiere al resto de aminoácido que está en la posición 392 según la numeración de H3 de Winter *et al.* (1981). Se observa que, debido a que en los polipéptidos de la invención se ha suprimido parte del dominio HA1 (el dominio de cabeza), la numeración, como se usa en el presente documento, no se refiere necesariamente a las posiciones reales de los aminoácidos en los polipéptidos de tallo de HA de la invención. La persona experta en la materia entenderá asimismo que pueden determinarse aminoácidos equivalentes en otras cepas y/o subtipos de virus de la gripe, tal como en H1 HA, y en los polipéptidos del tallo de la invención, mediante alineamiento de secuencias (como se muestra, p. ej. en la figura 14).

"Polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos unidos mediante enlaces amida como conocen los expertos en la materia. Como se usa en el presente documento, el término puede referirse a una única cadena polipeptídica unida mediante enlaces amida covalentes. El término también puede referirse a múltiples cadenas polipeptídicas asociadas mediante interacciones no covalentes tales como contactos iónicos, enlaces de hidrógeno, contactos de Van der Waals y contactos hidrófobos. Los expertos en la materia reconocerán que el término incluye polipéptidos que se han modificado, por ejemplo, mediante procesamiento postraduccional tal como escisión de péptido señal, formación de enlaces disulfuro, glucosilación (p. ej., glucosilación ligada a N y ligada a O), escisión por proteasa y modificación lipídica (p. ej., S-palmitoilación).

"Polipéptido de tallo de HA" se refiere a un polipéptido derivado de HA que no comprende el dominio de cabeza de una hemaglutinina (HA) de origen natural (o de tipo silvestre). Como se usa en el presente documento, la expresión "tipo silvestre" se refiere a HA de virus de la gripe que circulan de forma natural.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los virus de la gripe tienen un impacto significativo sobre la salud pública global, provocando millones de casos de enfermedad grave cada año, miles de muertes y pérdidas económicas considerables. Las vacunas contra la gripe trivalentes o tetravalentes actuales inducen una potente respuesta de anticuerpos neutralizantes a la cepas de vacuna y aislados estrechamente relacionados, pero rara vez se extienden a cepas más divergentes dentro de un subtipo o a otros subtipos. Además, la selección de las cepas de vacuna adecuadas presenta muchos retos y da lugar con frecuencia a protección subóptima. Asimismo, actualmente aún es imposible predecir el subtipo del siguiente virus pandémico, incluyendo cuándo y dónde aparecerá.

La hemaglutinina (HA) es la principal glucoproteína de la envoltura de los virus de la gripe A que es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes. La hemaglutinina tiene dos funciones principales durante el proceso de entrada. En primer lugar, la hemaglutinina media en la unión del virus a la superficie de células diana a través de interacciones con receptores de ácido siálico. En segundo lugar, después de la endocitosis del virus, la hemaglutinina desencadena posteriormente la fusión de las membranas vírica y endosómica para liberar su genoma en el citoplasma de la célula diana. HA comprende un ectodominio grande de ~500 aminoácidos que se escinde por enzimas procedentes del hospedador para generar 2 polipéptidos (HA1 y HA2) que permanecen unidos por un enlace disulfuro. La mayor parte del fragmento N-terminal (el dominio HA1, 320-330 aminoácidos) forma un "dominio de cabeza" globular distal de membrana que contiene el sitio de

unión a receptor y la mayoría de los determinantes reconocidos por anticuerpos neutralizantes de virus. La parte C-terminal más pequeña (dominio HA2, ~180 aminoácidos) forma una estructura de tipo tallo que ancla el dominio globular a la membrana celular o vírica. El grado de identidad de secuencia entre subtipos es menor en los polipéptidos de HA1 (identidad de 34 % - 59 % entre subtipos) que en el polipéptido de HA2 (identidad de 51 % - 80 %). La región más conservada es la secuencia alrededor del sitio de escisión de proteasa, en particular los 23 aminoácidos N-terminales de HA2, que está conservada entre todos los subtipos de virus de la gripe A (Lorieau *et al.*, 2010). Parte de esta región está expuesta como un bucle de superficie en la molécula precursora de HA (HA0), pero se vuelve inaccesible cuando HA0 se escinde para dar HA1 y HA2.

Los anticuerpos más neutralizantes se unen a los bucles que rodean el sitio de unión al receptor e interfieren de este modo en la unión al receptor y el acoplamiento. Ya que estos bucles son muy variables, la mayoría de anticuerpos que se dirigen a estas regiones son específicos de la cepa, lo que explica por qué las vacunas actuales provocan una inmunidad tan limitada, específica de la cepa. Recientemente, sin embargo, se han generado anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a hemaglutinina de virus de la gripe con amplia potencia de neutralización cruzada, tales como, p. ej., CR6261. Análisis funcionales y estructurales han revelado que estos anticuerpos interfieren en el proceso de fusión a la membrana y se dirigen frente a epítomos muy conservados en el dominio de tallo de la proteína HA de la gripe de grupo 1 (Throsby *et al.*, 2008; Ekiert *et al.* 2009, documento WO 2008/028946). Con la identificación de CR9114 (según se describe en el documento WO2013/007770) que reaccionan de manera cruzada con muchas moléculas de HA de grupo 1 y 2, se ha hecho evidente que es posible que el sistema inmunitario humano induzca anticuerpos neutralizantes muy amplios contra virus de la gripe. Sin embargo, dada la necesidad de un esquema de vacunación anual estos anticuerpos aparentemente no se inducen, o sólo se inducen en grado muy bajo, tras la infección o vacunación con virus de la gripe (estacionales) de subtipos H1 y/o H3.

Según la presente invención, se proporcionan polipéptidos de tallo de HA novedosos que se asemejan a los epítomos específicos del anticuerpo CR6261 (que comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12) y/o la región variable de cadena pesada del anticuerpo CR9114 (que comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 10). Los polipéptidos de la invención pueden usarse para inducir anticuerpos neutralizantes de virus de la gripe, preferentemente anticuerpos de neutralización cruzada cuando se administran *in vivo*, solos o en combinación con otros tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Con "anticuerpos de neutralización cruzada", se entienden anticuerpos que pueden neutralizar al menos dos, preferentemente al menos tres, cuatro o cinco subtipos diferentes de virus de la gripe A del grupo filogenético 1, o al menos dos, preferentemente al menos tres, cuatro o cinco subtipos diferentes de virus de la gripe A del grupo filogenético 2, o al menos dos subtipos diferentes de virus de la gripe B, o anticuerpos que son capaces de neutralizar al menos un virus de la gripe de grupo 1 y al menos un virus de la gripe de grupo 2 y/o al menos en virus de la gripe B.

Se han descrito previamente polipéptidos de tallo de HA de la gripe que presentan de manera estable los epítomos de estos anticuerpos en el documento WO2013/079473. Al menos algunos de estos polipéptidos de dominio de tallo HA fueron capaces de presentar de manera estable el epítomo de CR6261 y/o CR9114 y se mostró que eran inmunogénicos en ratones. Se han descrito polipéptidos de dominio de tallo de HA, capaces de presentar de manera estable el epítomo de CR6261 y/o CR9114 en los documentos WO2014/191435, WO2016/005480 y WO2016/005482.

Los polipéptidos de tallo de HA de la presente invención, que comprende modificaciones novedosas, muestra un mayor nivel de expresión en células de mamífero, una mayor propensión a trimerizar (p. ej., según lo medido mediante AlphaLISA) y/o un mayor nivel de termoestabilidad (p. ej., según lo medido mediante fluorimetría/calorimetría de exploración dinámica (DSF/DSC)), en comparación con los polipéptidos de tallo de HA descritos anteriormente. Además, la afinidad de todos los bnAb probados por el polipéptido de la invención es menor de 1 nM (medida mediante Octet y ELISA), que es similar a la afinidad de los anticuerpos por HA de longitud completa. Esto muestra claramente que los polipéptidos se asemejan al tallo de HA de longitud completa, nativa. Los polipéptidos de tallo de HA novedosos no requieren asimismo ningún conector artificial, marcador ni dominios de trimerización N o C-terminales.

La presente invención proporciona por tanto polipéptidos de tallo de hemaglutinina (HA) de la gripe A de grupo 1 que comprende un dominio HA1 y uno HA2, comprendiendo dichos polipéptidos una secuencia de aminoácidos que comprende, en comparación con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HA de longitud completa (HA0) que comprende un dominio HA1 y uno HA2:

- (i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1;
- (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación en la hélice C,
- (iii) al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro intramonomérico;
- (iv) al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro intermonomérico;

en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 434 es Q, y en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3 según Winter *et al.* (1981).

La presente invención proporciona por tanto polipéptidos de tallo de HA (es decir, polipéptidos de HA sin cabeza), que comprenden:

una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación en la hélice C,

al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro intramonomérico;

5 al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro intermonomérico;

en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 434 es Q, y en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3 como se usa en Winter *et al.* (1981).

10 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona polipéptidos de tallo de hemaglutinina (HA) de la gripe A de grupo 1 que comprende un dominio HA1 y uno HA2, en donde dichos polipéptidos de tallo de HA comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende, en comparación con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HA de longitud completa (HA0) que comprende un dominio HA1 y uno HA2 que comprende un dominio HA1 y uno HA2:

(i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1, comprendiendo dicha supresión al menos la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 302;

15 (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación en la región de trimerización en la hélice C, comprendiendo dicha región la secuencia de aminoácidos del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 419;

(iii) una cisteína en la posición 310 y una cisteína en la posición 422;

20 (iv) una cisteína en la posición 397 en combinación con una cisteína en la posición 405; o una cisteína en la posición 396 en combinación con una cisteína en la posición 408; o una cisteína en la posición 399 en combinación con una cisteína en la posición 405;

en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 434 es Q; en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3 según Winter *et al.* (1981).

25 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona polipéptidos de tallo de hemaglutinina (HA) de la gripe A de grupo 1 que comprende:

(i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1, comprendiendo dicha supresión al menos la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 302;

30 (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación de la región de trimerización en la hélice C, comprendiendo dicha región la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 419;

(iii) una mutación de los aminoácidos en las posiciones 310 y 422 a C;

35 (iv) una mutación del aminoácido en la posición 397 a C y una mutación del aminoácido en la posición 405 a C; o una mutación del aminoácido en la posición 396 a C y una mutación del aminoácido en la posición 408 a C; o una mutación del aminoácido en la posición 399 a C y una mutación del aminoácido en la posición 405 a C;

en donde los polipéptidos comprenden además al menos una mutación en el bucle B, comprendiendo dicho bucle B la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 385 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 404, en donde dicha al menos una mutación en el bucle B es una mutación del aminoácido en la posición 392 a P, R o Y, preferentemente a P o R; y en donde los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q;

40 en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3, como se usa en Winter *et al.* (1981).

Según la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que los polipéptidos de tallo de HA que tienen el resto de aminoácido Y, P o R, preferentemente P o R, en la posición 392, p. ej., introduciendo una mutación del aminoácido en la posición 392 en el bucle B a Y, P o R, preferentemente a P o R; en combinación con la posición de aminoácido Q en la posición 434, p. ej., introduciendo una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q, mostraron mayores niveles de expresión, una mayor propensión a trimerizar y/o una mayor estabilidad, en comparación con los polipéptidos de tallo de HA descritos anteriormente. Además, los polipéptidos de tallo de HA de la invención son capaces de inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la gripe.

50 Como conocen los expertos en la materia, una hemaglutinina de la gripe de longitud completa (HA0) comprende normalmente un dominio HA1 y un dominio HA2. El dominio de tallo está formado por dos segmentos del dominio HA1 y

- la mayoría o la totalidad del dominio HA2. Los dos segmentos del dominio HA1 están separados, en la secuencia primaria, por el dominio de cabeza globular. Como se describe en el presente documento, los polipéptidos de tallo de HA de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende varias modificaciones en el dominio HA1 y/o HA2, en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de HA de tipo silvestre, de longitud completa (HA0), en particular la secuencia de aminoácidos de una HA de grupo 1.
- 5 Por tanto, al menos parte de la cabeza muy variable e inmunodominante en el dominio HA1 del polipéptido de HA de la gripe, comprendiendo dicha parte al menos la secuencia de aminoácidos que comienza con el aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 302, se ha suprimido de la proteína de HA de longitud completa (HA0) para crear un polipéptido de tallo, también denominado "mini-HA" (figura 1A, segundo diseño). Las partes restantes del dominio HA1 están unidas, directamente o a través de un conector de 1 a 10 aminoácidos. Por tanto, por ejemplo, cuando la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 302 está suprimida, el aminoácido en la posición 52 está unido al aminoácido en la posición 303, directamente o mediante reemplazo de la región de cabeza suprimida con un conector de 1 a 10 aminoácidos. La supresión de la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 302 es la supresión mínima en el dominio HA1 (figura 1A, segundo diseño). Según la invención, también se puede suprimir una parte mayor del dominio HA1, p. ej., la secuencia de aminoácidos que comienza con el aminoácido en la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308, como se muestra en la figura 1A, tercer diseño.
- 10 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- 20 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 48 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- 25 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 49 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 50 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 51 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- 30 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 52 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- 35 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 305.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 48 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 304.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 48 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 305.
- 40 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 302.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- 45 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 48 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 49 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- 50 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 50 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.

- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 51 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 52 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- 5 En determinadas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 308.
- En una realización preferida, la supresión en el dominio HA1 comprende al menos la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- 10 En una realización preferida, la supresión en el dominio HA1 consiste en la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- En algunas realizaciones, la supresión en el dominio HA1 se ha reemplazado por una secuencia conectora de 1 a 10 aminoácidos.
- Además, los polipéptidos de tallo de HA de la invención comprenden una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación en la hélice C, para mejorar la trimerización de los polipéptidos de tallo de HA después de supresión de la región de cabeza. Según la invención, dicha modificación en el dominio HA2 es una modificación que potencia la trimerización del polipéptido de tallo de HA.
- 15 Además, los polipéptidos de tallo de HA de la invención comprenden una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación en la hélice C, para mejorar la trimerización de los polipéptidos de tallo de HA después de supresión de la región de cabeza. Según la invención, dicha modificación en el dominio HA2 es una modificación que potencia la trimerización del polipéptido de tallo de HA.
- En determinadas realizaciones, dicha modificación comprende la introducción de un dominio de trimerización heterólogo en la hélice C. Se entiende en general que la hélice C comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 434 (numeración de H3). En una realización preferida, dicho dominio de trimerización se ha introducido en una posición correspondiente a la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 419 (figura 1A). Por tanto, en determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos original (*wt*, *wild type*, tipo silvestre, *ts*) en el dominio HA2 desde la posición 405 hasta la posición 419, se ha reemplazado por una secuencia de trimerización heteróloga de la misma longitud, es decir con un número idéntico de aminoácidos.
- 20 En determinadas realizaciones, dicha modificación comprende la introducción de un dominio de trimerización heterólogo en la hélice C. Se entiende en general que la hélice C comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 434 (numeración de H3). En una realización preferida, dicho dominio de trimerización se ha introducido en una posición correspondiente a la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 419 (figura 1A). Por tanto, en determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos original (*wt*, *wild type*, tipo silvestre, *ts*) en el dominio HA2 desde la posición 405 hasta la posición 419, se ha reemplazado por una secuencia de trimerización heteróloga de la misma longitud, es decir con un número idéntico de aminoácidos.
- 25 En determinadas realizaciones, el dominio de trimerización heterólogo es una secuencia de GCN4.
- En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia de trimerización heteróloga comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 18);
- RIKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 19);
- 30 RMEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 20);
- RIEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 21);
- RMENLEKKVDDIEEK (SEQ ID NO: 22); y
- RIENLEKKVDDIEEK (SEQ ID NO: 23).
- En algunas realizaciones, al menos uno de los aminoácidos de la secuencia de trimerización heteróloga se ha mutado a C, permitiendo la formación de un enlace de cisteína intermonomérico.
- 35 En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia de trimerización heteróloga comprende por tanto una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 24);
- CIKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 25);
- 40 CMEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 26);
- CIEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 27);
- RMECLEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 28); y
- RIECLEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 29).
- En una realización preferida, la secuencia de trimerización heteróloga comprende la secuencia de aminoácidos
- 45 CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 24).

En determinadas realizaciones, la modificación comprende una optimización de la secuencia de repetición de héptada en la hélice C, preferentemente en la región de trimerización que comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 419. Una repetición de héptada, indicada como [abcdefg]_n, tiene normalmente restos hidrófobos en **a** y **d** y restos polares/con carga en **e** y **g**. Estos motivos son la base de la mayoría de estructuras superenrolladas, que son un motivo estructural en proteínas en las que las hélices alfa están enrolladas juntas como las hebras de una cuerda (los dímeros y trímeros son los tipos más habituales) (Ciani *et al.*, 2010).

Como modificación adicional, los polipéptidos de tallo de HA según la invención comprenden al menos dos restos de cisteína que forman (capaces de formar) un enlace de cisteína (o disulfuro) intramonomérico. Puede introducirse un enlace de cisteína modificado por ingeniería genética mutando al menos uno (si el otro ya es una cisteína), pero habitualmente mutando dos restos que están espacialmente cerca a cisteína, que formarán espontáneamente o por oxidación activa un enlace covalente entre los átomos de azufre de estos restos. En una realización preferida, los polipéptidos comprenden una cisteína en la posición 310 y una cisteína en la posición 422, que permiten la formación de un enlace de cisteína intramonomérico. En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en las posiciones 310 y 422 a C, creando dicho enlace de cisteína intramonomérico. Estos restos de cisteína forman, por tanto, un enlace de cisteína (o disulfuro) intramonomérico que estabiliza la proteína (véase figura 4).

Asimismo, para obtener polipéptidos de tallo de HA triméricos estables, los polipéptidos de la invención comprenden al menos dos restos de cisteína que forman un enlace de cisteína intermonomérico (interprotomérico). Por tanto, en determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una cisteína en la posición 397 en combinación con una cisteína en la posición 405; o una cisteína en la posición 396 en combinación con una cisteína en la posición 408; o una cisteína en la posición 399 en combinación con una cisteína en la posición 405.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 397 a C y una mutación del aminoácido en la posición 405 a C; o una mutación del aminoácido en la posición 396 a C y una mutación del aminoácido en la posición 408 a C; o una mutación del aminoácido en la posición 399 a C y una mutación del aminoácido en la posición 405 a C, creando un enlace de cisteína intermonomérico entre la cisteína en la posición 397 de un primer monómero y la cisteína en la posición 405 de un segundo monómero; o entre la cisteína en la posición 396 de un primer monómero y la cisteína en la posición 408 de un segundo monómero; o entre la cisteína en la posición 399 de un primer monómero y la cisteína en la posición 405 de un segundo monómero. Se observa que, en algunas realizaciones, los aminoácidos en las posiciones 405 y 408 están dentro de la secuencia de trimerización heteróloga.

En una realización preferida, los polipéptidos comprenden una cisteína en la posición 397 y una cisteína en la posición 405, creando un enlace de cisteína intermonomérico entre la cisteína en la posición 397 de un primer monómero y el aminoácido en la posición 405 de un segundo monómero.

En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 397 a cisteína y una mutación del aminoácido en la posición 405 a cisteína, creando un enlace de cisteína intermonomérico entre la cisteína en la posición 397 de un primer monómero y el aminoácido en la posición 405 de un segundo monómero.

Asimismo, en determinadas realizaciones, se ha introducido al menos una mutación en el denominado bucle B, comprendiendo dicho bucle B la secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido en la posición 385 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 404 (véase figura 1C). Según la invención, la al menos una mutación es una mutación del aminoácido en la posición 392 a P, R o Y, preferentemente a R o P. La mutación a R (un aminoácido con carga) elimina el aminoácido hidrófobo expuesto original (F en la mayoría de HA de la gripe) después de la retirada del dominio de cabeza y aumenta la solubilidad y expresión de los polipéptidos de tallo expresados. La mutación en un aminoácido P reduce la propensión de la hélice del bucle B. En determinadas realizaciones, la al menos una mutación en el bucle B es una mutación del aminoácido en la posición 392 a R. En determinadas realizaciones, la al menos una mutación en el bucle B es una mutación del aminoácido en la posición 392 en P.

Asimismo, en determinadas realizaciones de los polipéptidos de la invención, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 395 es I, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 399 es Y o C, preferentemente Y, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 400 es P, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 401 es K, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 402 es S y/o el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 404 es R o Q (numeración de nuevo según la numeración de H3). En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 392 es P o R, el aminoácido en la posición 395 es I; el aminoácido en la posición 399 es Y; el aminoácido en la posición 402 es S; y el aminoácido en la posición 404 es R o Q.

En realizaciones preferidas, los polipéptidos, en comparación con un polipéptido de HA de tipo silvestre, comprenden por tanto al menos una mutación adicional en el bucle B seleccionado del grupo que consiste en:

- una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 395 a I;
- una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 399 a Y o C, preferentemente Y;
- una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 400 a P;
- una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 401 a K;

- una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 402 a S; y
- una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 404 a Q o R.

5 En determinada realización, los polipéptidos, en comparación con un polipéptido de HA de tipo silvestre, comprenden una mutación del aminoácido en la posición 392 a P o R, una mutación del aminoácido en la posición 395 a I; una mutación del aminoácido en la posición 399 a Y; una mutación del aminoácido en la posición 402 a S; y opcionalmente una mutación del aminoácido en la posición 404 a Q o R.

En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 392 es P o R, el aminoácido en la posición 395 es I; el aminoácido en la posición 399 es Y; el aminoácido en la posición 401 es K; el aminoácido en la posición 402 es S; y opcionalmente el aminoácido en la posición 404 es R o Q.

10 En otra realización preferida, los polipéptidos, en comparación con un polipéptido de HA de tipo silvestre, comprenden una mutación del aminoácido en la posición 392 a P o R, una mutación del aminoácido en la posición 395 a I; una mutación del aminoácido en la posición 399 a Y; una mutación del aminoácido en la posición 401 a K; una mutación del aminoácido en la posición 402 a S; y opcionalmente una mutación del aminoácido en la posición 404 a R o Q.

15 En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden un bucle B que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

IEKMNTQYTAIGKEYNKSER (SEQ ID NO: 126);

IEKMNTQYTAIGCEYNKSER (SEQ ID NO: 127);

IEKMNTQPTAIGCEYNKSEQ (SEQ ID NO: 128);

IEKMNTQRTAIGCEFKNKSEQ (SEQ ID NO: 129);

20 IEKMNTQPTAIGCEYNKSER (SEQ ID NO: 130);

IEKMNTQPTAIGCEFKNKSEQ (SEQ ID NO: 131);

IEKMNTQRTAIGCEYNKSER (SEQ ID NO: 132);

IEKMNTQRTAICKEYPKSEQ (SEQ ID NO: 133); y

IEKMNTQRTAIGKECNKSER (SEQ ID NO: 134).

25 Asimismo, según la invención, el aminoácido en la posición 434 es Q. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de tallo de HA comprenden por tanto una mutación del aminoácido en la posición 434 en Q que mejora sus interacciones de enlaces de hidrógeno. En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 434 es Q y el aminoácido en la posición 442 es A. En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q y una mutación en la posición 442 a A. Estas mutaciones mejoran las interacciones de interfaces triméricas en las hélices D y E y el péptido de fusión y bucle B₂B₃ cercanos.

30 De nuevo se ha observado que, como se usa en el presente documento, la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la numeración de H3 según Winter *et al.* (1981). También se ha observado que la numeración de las posiciones de aminoácidos como se usa en el presente documento se basa en la numeración de las posiciones en un polipéptido de H3 HA de longitud completa (HA0). Por tanto, como se usa en el presente documento, "un aminoácido en la posición 434" se refiere al aminoácido en la posición 434 en H3 HA0. La numeración, por tanto, no se refiere a las posiciones reales de los aminoácidos en los polipéptidos de tallo de HA de la invención, debido a la supresión de la región de cabeza (véase figura 14).

35 Asimismo, en determinadas realizaciones, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 323 es K y/o el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 326 es K. En una realización preferida, el aminoácido en la posición 323 es K y el aminoácido en la posición 326 es K.

En determinadas realizaciones, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 339 es T.

En determinadas realizaciones, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 438 es E y/o el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 442 es I.

45 En determinadas realizaciones, los polipéptidos de tallo de HA comprenden además, por tanto, una o más mutaciones adicionales en el dominio HA1 y/o HA2, en comparación con un polipéptido de HA de tipo silvestre.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 323 a K y/o una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 326 a K. Estas mutaciones aumentan la solubilidad y expresión de la molécula. En otra realización, los polipéptidos de tallo de la invención comprenden una mutación del aminoácido en la posición 323 a K y mutación del aminoácido en la posición 326 a K.

- En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 339 a T. Esta mutación retira un aminoácido hidrófobo expuesto a disolvente en el bucle de péptido de fusión (bucle PF) y aumenta de este modo la solubilidad de la molécula.
- 5 En determinadas realizaciones preferidas, el aminoácido en la posición 323 es K, el aminoácido en la posición 326 es K, el aminoácido en la posición 339 es T, el aminoácido en la posición 392 es Y, P o R, preferentemente P o R, el aminoácido en la posición 395 es I, el aminoácido en la posición 399 es Y, el aminoácido en la posición 402 es S, el aminoácido en la posición 404 es Q o R, el aminoácido en la posición 434 es Q.
- 10 En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 323 a K, una mutación del aminoácido en la posición 326 a K, una mutación del aminoácido en la posición 339 a T, una mutación del aminoácido en la posición 392 a P o R, una mutación del aminoácido en la posición 395 a I, una mutación del aminoácido en la posición 399 a Y, una mutación del aminoácido en la posición 402 a S, una mutación del aminoácido en la posición 404 a Q o R y una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q.
- 15 En determinadas realizaciones preferidas, el aminoácido en la posición 323 es K, el aminoácido en la posición 326 es K, el aminoácido en la posición 339 es T, el aminoácido en la posición 392 es P o R, el aminoácido en la posición 395 es I, el aminoácido en la posición 399 es Y, el aminoácido en la posición 402 es S, el aminoácido en la posición 404 es Q o R, el aminoácido en la posición 434 es Q y el aminoácido en la posición 442 es A.
- 20 En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 323 a K, una mutación del aminoácido en la posición 326 a K, una mutación del aminoácido en la posición 339 a T, una mutación del aminoácido en la posición 392 a P o R, una mutación del aminoácido en la posición 395 a I, una mutación del aminoácido en la posición 399 a Y, una mutación del aminoácido en la posición 402 a S, una mutación del aminoácido en la posición 404 a Q o R y una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q, y una mutación en la posición 442 a A.
- 25 En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden al menos una mutación adicional seleccionada del grupo que consiste en una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 438 a E como un posible aminoácido con carga negativa alternativo y una mutación del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 442 a I para aumentar la hidrofobicidad en la interfaz trimérica.
- 30 Según la invención, el polipéptido de tallo de HA es un polipéptido de HA del grupo 1. Por tanto, según la invención, las modificaciones descritas en el presente documento se han introducido en HA de un virus de la gripe a partir del grupo filogenético 1, tal como un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H1, H2 o H5, que da lugar a polipéptidos de tallo de HA de la invención. En determinadas realizaciones, el polipéptido de tallo de HA es un polipéptido de H1 HA. Por tanto, en determinadas realizaciones, el polipéptido de tallo de HA procede de HA de un virus de la gripe A que comprende HA de un subtipo H1, tal como del virus de la gripe A/Brisbane/59/2007 (H1N1), con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o A/California/07/09 (H1N1), con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. La persona experta entenderá que los polipéptidos de la invención también pueden obtenerse de HA de otras cepas de virus de la gripe del grupo 1, incluyendo, pero sin limitación, A/Texas/UR06-0526/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 3), A/NewYork/629/1995 (H1N1) (SEQ ID NO: 4), A/AA_Marton/1943 (H1N1) (SEQ ID NO: 5), A/Puerto Rico/8/1934 (H1), A/Michigan/45/2015 (H1), A/Adachi/2/57 (H2N2) (SEQ ID NO: 6), A/Singapore/1/57 (H2N2) (SEQ ID NO: 7), o virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H5, incluyendo, pero sin limitación, A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (SEQ ID NO: 8) o A/Hong Kong/156/97 (H5).
- 35 Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de tallo pueden comprender o no una secuencia de unión de 1 - 10 restos de aminoácidos que reemplaza la secuencia de HA1 suprimida y de este modo une las dos partes de HA1 restantes.
- 40 En determinadas realizaciones, la secuencia de unión comprende de 1 a 5 aminoácidos. En determinadas realizaciones, la secuencia de unión comprende 2, 3 o 4 aminoácidos. La secuencia de unión puede ser una secuencia de unión heteróloga, es decir, una secuencia de aminoácidos que no aparece en HA de origen natural, o de tipo silvestre, tal como, pero sin limitación G, GS, GGG, GSG, GSA, GSGS, GSAG, GGGG, GSAGS, GSGSG, GSAGSA, GSAGSAG y GSGSGSG.
- 45 En realizaciones preferidas, la secuencia de unión es una secuencia de unión homóloga, es decir, una secuencia de aminoácidos procedente de la región de cabeza correspondiente suprimida tal como, pero sin limitación, AGSG, AGS, GSG, HAGA, DQEG, DTPV, FPKT, EPGD, EPG, TGNL. TPSS, TPS, ATGN, YPGD.
- En realizaciones preferidas, los polipéptidos no comprenden una secuencia de unión.
- 50 Como se ha descrito anteriormente, la escisión de la proteína HA0 de la gripe (en HA1 y HA2) es necesaria para su actividad, facilitando la entrada del genoma vírico en las células diana al provocar la fusión de la membrana endosómica del hospedador con la membrana vírica.
- 55 En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden el sitio de escisión de proteasa natural. Por tanto, se sabe que la secuencia Arg (R) - Gly (G) que abarca HA1 y HA2 (es decir, las posiciones de aminoácidos 329 y 330) es un sitio de reconocimiento para tripsina y proteasas de tipo tripsina y normalmente se escinde para activación de hemaglutinina (figura 1A).

- En determinadas realizaciones, los polipéptidos no comprenden un sitio de escisión de proteasa. Por tanto, en determinadas realizaciones preferidas, el sitio de escisión de proteasa se ha retirado mediante mutación del resto de aminoácido en la posición 329 a cualquier aminoácido distinto de arginina (R) o lisina (K). En determinadas realizaciones, el resto de aminoácido en la posición 329 no es arginina (R). En una realización preferida, los polipéptidos comprenden una mutación del aminoácido en la posición 329 a glutamina (Q). Por tanto, en determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden la mutación de inactivación de sitio de escisión R329Q para evitar la posible escisión de la molécula durante la producción *in vitro* o *in vivo* después de la administración.
- En otras realizaciones, los polipéptidos comprenden un sitio de escisión polibásico, p. ej., un sitio de escisión de furina (como se describe en el ejemplo 6). Por tanto, los polipéptidos pueden escindirse mediante proteasas de tipo furina en la célula para producir una mini-HA escindida, similar a una HA plegada de forma nativa y procesada.
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos no comprenden una secuencia señal. La secuencia señal (denominada en ocasiones péptido señal, señal de dirección, señal de localización, secuencia de localización, péptido de tránsito, secuencia líder o péptido líder) es un péptido corto (habitualmente 16-30 aminoácidos de longitud) que está presente en el extremo N de la mayoría de proteínas de nueva síntesis que están destinadas a la ruta secretora. Las secuencias señal actúan para inducir que una célula transloque la proteína, habitualmente a la membrana celular. En muchos casos, los aminoácidos que comprenden el péptido señal se escinden de la proteína una vez que se ha alcanzado su destino final. En HA de gripe, las secuencias señal comprenden normalmente los primeros 16 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la HA0 de longitud completa (correspondiente a los aminoácidos desde la posición -6 a la posición 10 según la numeración de H3).
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden (parte de) una secuencia señal. Los polipéptidos pueden comprender (parte de) la secuencia señal de tipo silvestre o pueden comprender (parte de) secuencias señal alternativas, tales como, pero sin limitación, una secuencia señal seleccionada del grupo de:
- MGSTAILGLLLAVLQGVCA (SEQ ID NO: 136) y
- MGMTSALLALLALALKPGAWA (SEQ ID NO: 137).
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden un dominio HA2 que incluye el dominio transmembrana y citoplasmático (correspondiente a la secuencia de aminoácidos que comienza con el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 515 hasta e incluyendo el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 550 (numeración de H3)).
- Para producir polipéptidos de tallo secretados (solubles), en determinadas realizaciones, los polipéptidos no comprenden el dominio transmembrana y citoplasmático. Por tanto, en determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden un dominio HA2 truncado, en particular un dominio HA2 que está truncado en el extremo C-terminal. Un dominio HA2 truncado según la invención es, por tanto, más corto que la secuencia de HA2 de longitud completa, por supresión de uno o más restos de aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio HA2.
- En determinadas realizaciones, la parte C-terminal del dominio HA2 que comienza con el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 516 se ha suprimido, retirando de este modo sustancialmente el dominio transmembrana y citoplasmático completo.
- En determinadas realizaciones, también se ha suprimido una parte de la hélice C-terminal. Según la presente invención, se ha descubierto que incluso cuando se suprime una parte mayor del dominio HA2, se pueden proporcionar polipéptidos de tallo de HA solubles. Por tanto, en determinadas realizaciones, la parte C-terminal del dominio HA2 que comienza en la secuencia de aminoácidos en la posición 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514 o 515 se ha suprimido (de nuevo numeración de H3 como se ha descrito en Winter *et al.*, mencionado anteriormente) para producir un polipéptido soluble después de la expresión en células (figura 12).
- En una realización preferida, se ha suprimido la parte C-terminal del dominio HA2 desde la posición correspondiente a 516.
- Opcionalmente, se ha unido una secuencia de aminoácidos heteróloga (es decir, una secuencia de aminoácidos que no aparece de forma natural en HA de la gripe) con el dominio HA2 (truncado).
- Por tanto, en determinadas realizaciones, se han unido secuencias de marcador de His, p. ej. HHHHHH (SEQ ID NO: 113) o HHHHHHHH (SEQ ID NO: 114) o un marcador FLAG (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 115) o una combinación de estas con el aminoácido C-terminal del dominio HA2 (opcionalmente truncado) para fines de detección y/o purificación. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos heteróloga, tal como la secuencia de marcador de His, puede estar conectada al dominio HA2 (truncado) mediante un conector. En determinadas realizaciones, el conector puede contener (parte de) un sitio de escisión proteolítica, p. ej., la secuencia de aminoácidos IEGR (SEQ ID NO: 116) o LVPRGS (SEQ ID NO: 117) para eliminar enzimáticamente la secuencia de marcador de His después de la purificación.
- En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos heteróloga que está unida al aminoácido C-terminal del dominio HA2 (truncado) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

ES 2 926 243 T3

- GYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL (dominio de plegamiento), (SEQ ID NO: 118),
- SGRDYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGHHHHHH (Flag – Dominio de plegamiento – Marcador de His), (SEQ ID NO: 119),
- 5 SGRDYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH (FLAG- Conector GS – Marcador de His), (SEQ ID NO: 120),
- EGRAAAGGSGGGGSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEG LSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGLWNGNKIIDERLINPDG SLLFRVTINGVTGWRLCERILAAAASHWPQFEKGAASHWPQFEKGAASHWPQFEK (Nanoluc – Marcador de estrep), (SEQ ID NO: 121),
- 10 EGRAAAGGSGGGGSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEG LSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGLWNGNKIIDERLINPDG SLLFRVTINGVTGWRLCERILAGAAEPEA (Nanoluc – Marcador de C), (SEQ ID NO: 122),
- EGRAAASHWPQFEKGAASHWPQFEKGAASHWPQFEK (Marcador de estrep), (SEQ ID NO: 154),
- EGRAALPETGGGAAEPEA (Sortasa - Marcador de C), (SEQ ID NO: 123),
- 15 SGRDYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWHPQFEKGAASHWPQFEKGAASHWPQFEK (FLAG – Conector GS – Marcador de estrep), (SEQ ID NO: 124) y
- EGRAAAEQKLISEEDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWHPQFEKGAASHWPQFEKGAASHWPQFEK (Marcador de Myc - Conector GS – Marcador de estrep), (SEQ ID NO: 125).
- 20 En determinadas realizaciones, se ha unido un dominio de trimerización heterólogo con el aminoácido C-terminal del dominio HA2 (opcionalmente truncado), tal como, pero sin limitación, un dominio de trimerización "de plegamiento" (como se describe en Letarov *et al.* (1993); S-Guthe *et al.* (2004)),
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos de tallo de HA comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 30;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 31;
- 25 una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 52;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 53;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 54;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 55;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 56;
- 30 una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 57;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 58;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-237 de la SEQ ID NO: 59;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 60;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 61;
- 35 una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 62;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 63;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-230 de la SEQ ID NO: 64;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-231 de la SEQ ID NO: 65;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-232 de la SEQ ID NO: 66;
- 40 una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-233 de la SEQ ID NO: 67;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 68;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-235 de la SEQ ID NO: 69;

- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-237 de la SEQ ID NO: 107;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 108;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-231 de la SEQ ID NO: 109;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-231 de la SEQ ID NO: 110;
- 5 una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-237 de la SEQ ID NO: 111;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-237 de la SEQ ID NO: 112;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-234 de la SEQ ID NO: 135;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 18-248 de la SEQ ID NO: 147;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 18-248 de la SEQ ID NO: 148;
- 10 una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 18-248 de la SEQ ID NO: 149;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 17-247 de la SEQ ID NO: 150;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 17-247 de la SEQ ID NO: 151;
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 16-246 de la SEQ ID NO: 152; o
- una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 18-248 de la SEQ ID NO: 153.
- 15 En una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-231 de las SEQ ID NO: 103, 104, 109 o 110.
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 31, 31, 52-112 y 135.
- 20 En una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 103, 104, 109 y 110.
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos se glucosilan cuando se expresan en células adecuadas (p. ej., células de mamífero). Los polipéptidos pueden contener uno o más motivos de glucosilación nativos. En determinadas realizaciones, los polipéptidos comprenden al menos un motivo de glucosilación adicional/introducido. En determinadas realizaciones, el al menos un motivo de glucosilación se ha introducido mediante una mutación del aminoácido en la
- 25 posición 402 a S. Esta mutación introducirá un motivo de glucosilación ligado a n en la posición 400.
- Los polipéptidos también pueden administrarse en combinación con nanopartículas o conjugados con nanopartículas, tales como, p. ej., polímeros, liposomas, virosomas, partículas de tipo vírico. Los polipéptidos pueden combinarse con, encapsularse en o conjugarse (p. ej., unirse covalentemente o adsorberse) con las nanopartículas
- 30 La invención proporciona además moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de tallo de HA de la gripe de la invención. Un experto entiende que numerosas moléculas de ácido nucleico diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. También se entiende que los expertos, usando técnicas de rutina, pueden realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos descritos para reflejar el uso codónico de cualquier organismo hospedador particular en el que se van a expresar los polipéptidos. Por lo tanto, a menos que se especifique otra cosa, una "molécula de ácido nucleico que
- 35 codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos.
- En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de tallo de HA de la gripe tienen codones optimizados para la expresión en células de mamífero, tales como células humanas. Se conocen y se han descrito previamente métodos de optimización de codones (p. ej., el documento WO 96/09378).
- 40 En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de tallo de HA de la gripe comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 138-145.
- Los polipéptidos de dominio de tallo de hemaglutinina de la gripe pueden prepararse según cualquier técnica que se considere adecuada por un experto, incluyendo técnicas descritas a continuación. Por tanto, los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse como secuencias de ADN mediante métodos convencionales conocidos en la técnica y clonarse y posteriormente expresarse, *in vitro* o *in vivo*, usando enzimas de restricción adecuadas y métodos conocidos en la técnica.
- 45

La invención se refiere además a vectores que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico según la invención es, por tanto, parte de un vector, p. ej., un plásmido. Dichos vectores pueden manipularse con facilidad mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia y, por ejemplo, pueden diseñarse de manera que puedan replicarse en células procariontas y/o eucariotas. El vector usado puede ser cualquier vector que sea adecuado para clonar ADN y que pueda utilizarse para transcripción de un ácido nucleico de interés. Cuando se usen células hospedadoras, se prefiere que el vector sea un vector integrante. Como alternativa, el vector puede ser un vector de replicación episómica. El experto en la materia es capaz de elegir vectores de expresión adecuados e insertar las secuencias de ácido nucleico de la invención de manera funcional. Para obtener la expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, los expertos en la técnica conocen bien que pueden unirse funcionalmente secuencias que pueden impulsar la expresión a las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido, dando lugar a moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican una proteína o un polipéptido en un formato que puede expresarse. Las secuencias que impulsan la expresión pueden incluir promotores, potenciadores y similares, y combinaciones de los mismos. Estas deben poder actuar en la célula hospedadora, impulsando de este modo la expresión de las secuencias de ácido nucleico que están funcionalmente unidas a ellas. El experto en la materia es consciente de que pueden usarse diversos promotores para obtener la expresión de un gen en células hospedadoras. Los promotores pueden ser constitutivos o pueden estar regulados, y pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, incluyendo virus, fuentes procariontas o eucariotas, o diseñarse por medios artificiales. La expresión de ácidos nucleicos de interés puede ser a partir del promotor natural o derivado del mismo o de un promotor totalmente heterólogo (Kaufman, 2000). Algunos promotores bien conocidos y muy usados para la expresión en células eucariotas comprenden promotores procedentes de virus, tales como adenovirus, p. ej., el promotor E1A, promotores procedentes de citomegalovirus (CMV), tales como el promotor inmediato temprano (IE) de CMV (denominado en el presente documento promotor de CMV) (que puede obtenerse, por ejemplo, a partir de pcDNA, Invitrogen), promotores procedentes de virus de simio 40 (SV40) (Das *et al.*, 1985) y similares. También pueden obtenerse promotores adecuados de células eucariotas, tales como promotores de metalotioneína (MT), promotor de factor de elongación 1 α (Ef-1 α) (Gill *et al.*, 2001), promotor de ubiquitina C o UB6 (Gill *et al.*, 2001), promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, promotores de choque térmico y similares. El análisis de la función promotora y la fuerza de un promotor es una cuestión rutinaria para un experto en la materia y, en general, puede abarcar, por ejemplo, la clonación de un gen de prueba tal como lacZ, luciferasa, GFP, etc. detrás de la secuencia de promotor y analizar la expresión del gen de prueba. Evidentemente, los promotores pueden alterarse mediante supresión, adición, mutación de secuencias en los mismos y ensayarse para determinar la funcionalidad, para encontrar secuencias de promotor nuevas, atenuadas o mejoradas. Según la presente invención, se prefieren fuertes promotores que proporcionen altos niveles de transcripción en las células eucariotas de elección.

Las construcciones pueden transfectarse en células eucariotas (p. ej., células vegetales, fúngicas, de levaduras o animales) o sistemas de expresión procariontas adecuados como *E. coli* usando métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia. En algunos casos puede añadirse una secuencia "marcadora" adecuada (tal como, por ejemplo, pero sin limitación, un marcador de his, myc, estrep o flag) o proteína completa (tal como, por ejemplo, pero sin limitación, proteína de unión a maltosa o glutatión S transferasa) a las secuencias de la invención, como se ha descrito anteriormente, para permitir la purificación y/o identificación de los polipéptidos a partir de las células o el sobrenadante. Opcionalmente, puede incluirse una secuencia que contenga un sitio proteolítico específico para posteriormente eliminar el marcador mediante digestión proteolítica.

En realizaciones, preferidas, los polipéptidos se producen en células de mamífero.

Los polipéptidos purificados pueden analizarse mediante métodos espectroscópicos conocidos en la técnica (p. ej., espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier y espectroscopia de RMN o cristalografía de rayos X) para investigar la presencia de estructuras deseadas como hélices y láminas beta. Pueden usarse ELISA, AlphaLISA, interferometría de biocapas (Octet) y FACS y similares para investigar la unión de los polipéptidos de la invención a los anticuerpos ampliamente neutralizantes, tales como CR6261 y/o CR9114. Por tanto, pueden seleccionarse polipéptidos según la invención que tienen la conformación correcta. El contenido trimérico puede analizarse, por ejemplo, usando electroforesis en gel de SDS en condiciones no reductoras, cromatografía de exclusión por tamaño en presencia de fragmentos Fab de anticuerpo de anticuerpos ampliamente neutralizantes, tales como CR6261 y/o CR9114, así como AlphaLISA usando anticuerpos marcados de forma diferente. La estabilidad de los polipéptidos puede evaluarse como se ha descrito anteriormente después de tensión por temperatura, ciclos de congelación-descongelación, aumento de la concentración de proteínas o agitación. La temperatura de fusión del polipéptido puede evaluarse adicionalmente mediante fluorimetría de exploración diferencial (DSF) y/o calorimetría de exploración diferencial (DSC).

En determinadas realizaciones, el vector es un adenovirus recombinante humano. La presente invención también proporciona, por tanto, vectores adenovíricos recombinantes que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de tallo de HA según la invención. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de tallo comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 y SEQ ID NO: 145.

La preparación de vectores adenovíricos recombinantes es muy conocida en la técnica. El término "recombinante" para un adenovirus, como se usa en el presente documento, implica que ha sido modificado por la mano del hombre, p. ej., tiene extremos terminales alterados activamente clonados en los mismos y/o comprende un gen heterólogo, es decir, no

es un adenovirus de tipo silvestre de origen natural. En determinadas realizaciones, un vector adenovirico según la invención es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1, p. ej., la región E1a y/o la región E1b, del genoma adenovirico que es necesario para la replicación vírica. En determinadas realizaciones, un vector adenovirico según la invención es deficiente en al menos parte de la región E3 no esencial. En determinadas realizaciones, el vector es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1 y al menos parte de la región E3 no esencial. El vector adenovirico puede ser "deficiente múltiple", lo que significa que el vector adenovirico es deficiente en una o más funciones génicas esenciales en cada una de dos o más regiones del genoma adenovirico. Por ejemplo, los vectores adenoviricos deficientes en E1 o E1, E3 mencionados anteriormente pueden ser deficientes además en al menos un gen esencial de la región E4 y/o al menos un gen esencial de la región E2 (p. ej., la región E2A y/o región E2B). En la técnica se conocen bien vectores adenoviricos, métodos para la construcción de los mismos y los métodos para la propagación de los mismos y se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191 y 6,113,913.

En ciertas realizaciones, el adenovirus es un adenovirus humano del serotipo 26 o 35.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, un ácido nucleico y/o un vector según la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención en particular se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos, ácidos nucleicos y/o vectores de la invención. Las composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el transportador, a las dosificaciones y concentraciones empleadas, no provocará efectos perjudiciales o no deseados en los sujetos a los que se les administra. Dichos transportadores y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor y Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). El término "transportador" se refiere a un diluyente, excipiente o vehículo con el que se administran los polipéptidos, ácidos nucleicos y/o vectores. Pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, p. ej., como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables.

La invención se refiere además a polipéptidos, ácidos nucleicos y/o vectores como se describen en el presente documento para su uso como un medicamento.

La invención también se refiere a polipéptidos, ácidos nucleicos y/o vectores como se describen en el presente documento para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un virus de la gripe.

La invención también se refiere a un polipéptido, una molécula de ácido nucleico y/o un vector como se ha descrito anteriormente para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria mediante la administración contra un virus de la gripe A en un sujeto que lo necesita. Un sujeto según la invención es preferiblemente un mamífero que puede verse infectado por un virus de la gripe o que de otro modo puede beneficiarse de la inducción de una respuesta inmunitaria, siendo dicho sujeto, por ejemplo, un roedor, p. ej., un ratón, un hurón o un animal doméstico o de granja, o un primate no humano, o un ser humano. Preferentemente, el sujeto es un sujeto humano.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona usos médicos para inducir una respuesta inmunitaria frente a un virus de la gripe A del grupo 1. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta inmunitaria humoral (es decir, la inducción de anticuerpos neutralizantes del virus de la gripe) y/o una celular. En determinadas realizaciones, la invención proporciona usos médicos para inducir una respuesta inmunitaria frente a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis subtipos de virus de la gripe A. En determinadas realizaciones, la invención proporciona usos médicos para inducir una respuesta inmunitaria frente a un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H1.

En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida es eficaz para prevenir y/o tratar una infección por virus de la gripe provocada por un virus de la gripe del grupo 1, tal como un virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H1, y/o un virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H2 y/o un virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H5. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida es eficaz para prevenir y/o tratar una infección por virus de la gripe provocada por un virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H1.

La invención se refiere además a polipéptidos, ácidos nucleicos y/o vectores como se describen en el presente documento para su uso como una vacuna de la gripe.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico y/o los vectores de la invención se administran en combinación con un adyuvante. El adyuvante puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración de los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico y/o los vectores de la invención. Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio; composiciones de emulsiones oleosas (o composiciones de aceite en agua), incluyendo emulsiones de escualeno en agua, tales como MF59 (véase, p. ej., documento WO 90/14837); formulaciones de saponina, tales como, por ejemplo, QS21 y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS) (véase, p. ej., documentos US 5,057,540, WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762 o WO 2005/002620); derivados bacterianos o microbianos, ejemplos de los cuales son lípido de monofosforilo A (MPL), MPL 3-O-desacilado (3dMPL), oligonucleótidos que contienen motivos de CpG, toxinas

bacterianas de ribosilación de ADP o mutantes de los mismos, tales como enterotoxina LT termolábil de *E. coli* o la toxina CT del cólera, toxina PT de pertussis o toxoide del tétanos TT, Matrix M o combinaciones de los mismos. Además, pueden usarse tecnologías de inmunopotenciación conocidas, tales como fusionar los polipéptidos de la invención con proteínas conocidas en la técnica para potenciar la respuesta inmunitaria (p. ej., toxoide del tétanos, CRM197, rCTB, flagelinas bacterianas u otras) o incluyendo los polipéptidos en virosomas, o combinaciones de los mismos.

La administración de los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y/o vectores según la invención puede realizarse usando vías de administración convencionales. Los ejemplos no limitativos incluyen la administración parenteral, tal como intravenosa, intradérmica, transdérmica, intramuscular, subcutánea, etc., o la administración mucosa, p. ej., intranasal, oral y similares. El experto podrá determinar las diversas posibilidades de administrar los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico y/o los vectores según la invención, con el fin de inducir una respuesta inmunitaria.

En determinadas realizaciones, el polipéptido, la molécula de ácido nucleico y/o el vector se administra más de una vez, es decir en un denominado régimen homólogo de sensibilización-refuerzo. La administración de la segunda dosis puede realizarse, por ejemplo, una semana después de la administración de la primera dosis, dos semanas después de la administración de la primera dosis, tres semanas después de la administración de la primera dosis, un mes después de la administración de la primera dosis, seis semanas después de la administración de la primera dosis, dos meses después de la administración de la primera dosis, 3 meses después de la administración de la primera dosis o 4 meses después de la administración de la primera dosis, etc., hasta varios años después de la administración de la primera dosis del polipéptido, molécula de ácido nucleico y/o vector de la invención. También es posible administrar los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico y/o los vectores más de dos veces, p. ej., tres veces, cuatro veces, etc., de modo que la primera administración de sensibilización va seguida de más de una administración de refuerzo.

Los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico y/o los vectores también pueden administrarse, bien como sensibilización o bien como refuerzo, en un régimen heterólogo de sensibilización-refuerzo.

La invención proporciona además un polipéptido, una molécula de ácido nucleico y/o un vector como se ha descrito en el presente documento para su uso en la prevención y/o tratamiento mediante administración a dicho sujeto, preferentemente previniendo, una enfermedad de tipo gripe en un sujeto que lo necesita.

Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del polipéptido, ácido nucleico y/o vector que es eficaz para prevenir, mejorar y/o tratar una enfermedad o una afección resultante de infección por un virus de la gripe. La prevención abarca inhibir o reducir la propagación de virus de la gripe o inhibir o reducir la aparición, el desarrollo o la progresión de uno o más de los síntomas asociados con la infección por un virus de la gripe. La mejora tal como se utiliza en el presente documento puede referirse a la disminución de los síntomas visibles o perceptibles de una enfermedad, viremia o de cualquier otra manifestación medible de infección por gripe.

Un sujeto que necesita tratamiento incluye sujetos que ya padecen una afección resultante de la infección con un virus de la gripe, así como aquellos en los que debe prevenirse la infección con virus de la gripe. Los polipéptidos, ácido nucleico y/o vectores de la invención pueden administrarse, por tanto, a un sujeto sin exposición previa, es decir, un sujeto que no tiene una enfermedad provocada por infección de virus de la gripe o no se ha infectado y no está actualmente infectado con una infección por virus de la gripe, o a sujetos que ya han estado infectados con un virus de la gripe.

En una realización, la prevención y/o el tratamiento pueden dirigirse a grupos de pacientes que son propensos a infección por virus de la gripe. Dichos grupos de pacientes incluyen, pero sin limitación, p. ej., los ancianos (p. ej., ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y, preferiblemente, ≥ 65 años de edad), los jóvenes (p. ej., ≤ 5 años de edad, ≤ 1 año de edad), pacientes hospitalizados, sujetos inmunodeprimidos y pacientes que se han tratado con un compuesto antivírico pero que han mostrado una respuesta antivírica inadecuada.

Los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y/o vectores de la invención pueden administrarse a un sujeto en combinación con uno o más de otros agentes activos, tales como vacunas alternativas para gripe, anticuerpos monoclonales, agentes antivíricos, agentes antibacterianos y/o agentes inmunomoduladores. El o los agentes activos adicionales pueden ser beneficiosos en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad por virus de la gripe o pueden mejorar un síntoma o estado asociado con una enfermedad de virus de la gripe. En algunas realizaciones, el o los agentes activos adicionales son analgésicos, medicamentos antipiréticos o terapias que alivian o ayudan con la respiración.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos y figuras.

EJEMPLOS

50 **Ejemplo 1:** Preparación de polipéptidos basados en tallo de la invención

En el documento WO2013/079473, se describió una primera serie de polipéptidos de tallo de hemaglutinina de la gripe, composiciones y vacunas y métodos de su uso en la prevención y/o el tratamiento de la gripe, incluyendo los polipéptidos H1-mini2-grupo 1+5+6-GCN, ambos como forma unida a membrana (con dominio transmembrana natural, SEQ ID NO: 45 en el documento WO2013/079473) y como forma soluble del mismo, s-H1-mini2-grupo1+5+6-GCN4 (sin dominio transmembrana natural, SEQ ID NO: 145 en el documento WO2013/079473).

En el documento WO2014/191435, se describieron polipéptidos de tallo adicionales procedentes de la HA de longitud completa de H1N1 A/Brisbane/59/2007, que comprendían mutaciones adicionales en comparación con H1-mini2-grupo1+5+6-GCN4, y también presentaron de manera estable el epítipo ampliamente neutralizante de CR6261 y/o CR9114.

5 Estos polipéptidos de tallo se crearon todos suprimiendo el dominio de cabeza de HA1, en particular la región que comprende los aminoácidos desde la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306, y reemplazando la región suprimida con un conector, como se describe en el documento WO2013/079473. Se observa que en el documento WO2013/079473, la numeración de las posiciones de aminoácidos se basó en la numeración de HA de longitud completa de gripe A/Brisbane/59/2007 (es decir, SEQ ID NO: 1 en el documento WO2013/079473), mientras que
10 en la presente invención se usa la numeración de H3 de Winter *et al.*

La eliminación del dominio de cabeza deja expuesta parte de la molécula que anteriormente estaba protegida del disolvente acuoso, desestabilizando de este modo la estructura de los polipéptidos de la invención. Por esta razón, uno o más restos de aminoácidos en el bucle B, es decir, la región que comprende los aminoácidos 385-404 (figura 1C) se mutaron para estabilizar los polipéptidos. De manera similar, en la zona alrededor del péptido de fusión, varios restos
15 hidrófobos están expuestos al disolvente, provocado por el hecho de que, a diferencia de la HA de longitud completa nativa, los polipéptidos no pueden escindirse y experimentar el cambio conformacional asociado que interna el péptido de fusión hidrófobo en el interior de la proteína. Para abordar este problema, algunos o la totalidad de los restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 323, 326 y 339 se mutaron a restos hidrófilos en comparación con la HA de longitud completa de tipo silvestre de A/Brisbane/59/2007.

20 Asimismo, los polipéptidos eran resistentes a escisión por proteasa por una mutación del sitio de escisión natural, p. ej., por mutación del aminoácido en la posición 329 a Q.

En el documento WO2016/005480 se describió una serie adicional de polipéptidos de tallo, en donde la secuencia procedente de GCN4 RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 18) se introdujo en la posición 405 a 419, tal como, p. ej., los polipéptidos designados 127H1-t2, s127H1-t2 y s127H1-t2largo, procedentes de A/Brisbane/59/2007. Además, se
25 prepararon polipéptidos tallo con las mismas modificaciones usando HA de diferentes cepas de gripe, por ejemplo, polipéptidos basados en HA procedentes de la cepa H1N1 A/California/07/09, tales como smH1Calí3964-127H1-t2 y mH1 Calí3964-127H1-t2.

En el documento WO2016/005482, se describió la introducción de un enlace de cisteína intermonomérico, lo que da lugar a mayores cantidades de polipéptidos de tallo trimérico, incluyendo los polipéptidos designados 127H1-t2-cl18 (también
30 denominado 5367) y la versión soluble 127H-t2-cl18largo, que se basaron en HA de gripe A/Brisbane/59/2007. Se diseñaron polipéptidos similares basados, p. ej., en HA del virus de la gripe A/California/07/09, p. ej., los polipéptidos designados mH1 Calí3964-127H1-t2-cl18 (también denominado 5369) y smH1 Calí3964-127H1-t2-cl18largo. Estos polipéptidos de tallo comprendían, entre otras cosas, una supresión de la región de cabeza que comprendía los aminoácidos desde la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306, en donde los dominios HA1
35 resultantes se unieron mediante un conector de 4 aminoácidos (GGGG); la secuencia procedente de GCN4 RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 18) introducida en el dominio HA2 en la posición 405-419; y una mutación del aminoácido en la posición 329 a Q para hacer al polipéptido resistente a escisión por proteasa. Los polipéptidos comprendían además una mutación del aminoácido en la posición 397 a C y una mutación del aminoácido en la posición 405 a C (es decir, el primer aminoácido de la secuencia de GCN4), formando, por tanto, un enlace de cisteína
40 intermonomérico entre la cisteína en la posición 397 de un primer monómero y el aminoácido en la posición 405 de un segundo monómero.

En la investigación que condujo a la presente invención, se han optimizado los polipéptidos de tallo descritos anteriormente. Las secuencias de aminoácidos de la HA de tipo silvestre procedente de A/Brisbane/59/2007 y/o
45 A/California/07/09 son las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Los polipéptidos UFV5367 (SEQ ID NO: 16) y UFV5369 (SEQ ID NO: 17) se denominan en el presente documento "cepas/construcciones parentales" (mostrados esquemáticamente en las figuras 2 y 3, respectivamente).

Por tanto, se diseñaron polipéptidos de HA novedosos, incluyendo, p. ej., UFV150558 (SEQ ID NO: 30) y UFV150850 (SEQ ID NO: 53), que comprenden modificaciones adicionales en comparación con los polipéptidos de tallo descritos anteriormente UFV5367 (SEQ ID NO: 16) y UFV5369 (SEQ ID NO: 17). En particular, los polipéptidos UFV150558 y
50 UFV150850 comprenden una mutación del aminoácido en la posición 392 en el bucle B a P o R, en combinación con una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q, o una mutación del aminoácido en la posición 392 en el bucle B a P o R, en combinación con una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q y una mutación en la posición 442 a A.

Además, se diseñaron polipéptidos de tallo adicionales en donde no se usó ningún conector artificial para reemplazar la región de cabeza suprimida. Los polipéptidos de tallo UFV160655 (SEQ ID NO: 103), UFV160656 (SEQ ID NO: 104),
55 UFV160664 (SEQ ID NO: 109) y UFV160665 (SEQ ID NO: 110) comprendían una supresión de la región de cabeza desde el aminoácido en la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306, dejando de este modo una primera parte del dominio HA1 que comprende los aminoácidos hasta e incluyendo el aminoácido 46, y una segunda parte del dominio HA1 que comprende los aminoácidos desde el aminoácido en la posición 307 hasta el aminoácido C-terminal del dominio HA1 (es decir, el aminoácido en la posición 329). La primera parte de HA1 se unió directamente con la segunda

parte de HA1 después de la supresión de la cabeza, es decir, el aminoácido restante en la posición 46 (el aminoácido C-terminal de la primera parte del dominio HA1) se conectó directamente con el aminoácido restante en la posición 307 (el aminoácido N-terminal de la segunda parte del dominio HA1). No se introdujo ningún conector artificial (véase figura 1A, construcción inferior). Los péptidos también comprendían las mutaciones adicionales del aminoácido en la posición 392 en el bucle B a P o R, en combinación con una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q, o en combinación con una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q y una mutación en la posición 442 a A (como se muestra esquemáticamente en la figura 4).

Ejemplo 2: *Expresión de los polipéptidos según la invención*

Expresión de proteínas en células de mamífero

Se sintetizaron fragmentos de ADN que codificaban los polipéptidos de la invención UFV150558, UFV150850, UFV160655, UFV160656, UFV160664 y UFV160665 (Genscript) y se clonaron en el plásmido pcDNA2004 (vector pcDNA3 modificado de manera interna con un promotor de CMV mejorado). Los polipéptidos se produjeron en células HEK293F cultivadas en medio Freestyle™ mediante transfección transitoria usando reactivo de transfección 293fectin™ (Invitrogen) de los plásmidos de expresión preparados. Los polipéptidos se produjeron en cultivos de células Expi-CHO en medio de expresión ExpiCHO™ mediante transfección transitoria usando el reactivo de transfección ExpiFectamine™ (Gibco, ThermoFisher Scientific). Para el cultivo de células Expi-CHO, se añadieron el potenciador ExpiFectamine CHO y alimento ExpiCHO (Gibco, ThermoFisher Scientific) 1 día después de la transfección. Se recogieron sobrenadantes de cultivo que contenían los polipéptidos entre los días 7-11 (para células ExpiCHO) mediante centrifugación, seguido de filtración sobre un filtro superior de frasco de 0.2 µm (Corning).

Análisis de sobrenadante de cultivo

El nivel de polipéptido expresado en el sobrenadante de cultivo recogido se evaluó mediante interferometría de biocapa usando la plataforma OCTET. En resumen, el mAb biotinilado CR9114 se inmovilizó en biosensores de estreptavidina (SA) (Pall FortéBio) después de lo cual, se estableció una curva patrón evaluando el desplazamiento de unión de una serie de diluciones de un polipéptido homólogo purificado bien definido. Posteriormente, se midió el desplazamiento de unión de sobrenadantes de cultivo recogidos prediluidos que contienen los polipéptidos de la invención (5-15 µg/ml diluidos en tampón de cinética) y se calculó la concentración de los polipéptidos usando la curva patrón establecida.

El contenido de trímeros de los polipéptidos en los sobrenadantes de cultivo se evaluó en AlphaLISA mediante la unión simultánea de 1.5 nM de CR9114 y 1.5 nM de un anticuerpo de un solo dominio marcado con Streptactin (SD15016) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 13. Se midió la emisión quimioluminiscente de 615 nm después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente de los polipéptidos con el anticuerpo y anticuerpo de un solo dominio en presencia de perlasceptoras anti-IgG humano y donantes de Streptactin (Perkin Elmer). Solo las moléculas triméricas que presentaban más de un epítipo plegado correctamente se unieron con ambos anticuerpos simultáneamente y, por tanto, proporcionaron una señal en este ensayo (en contraste con monómeros y agregados potenciales). Los polipéptidos se valoraron en función de la concentración de proteínas, como se evaluó mediante OCTET.

Resultados y conclusión

Se determinaron los niveles de expresión del polipéptido y el contenido de trímeros para tres transfecciones independientes de 70 ml de ExpiCHO el día 9 después de la transfección. Los resultados se muestran en la figura 5. En comparación con la construcción descrita anteriormente 5367 (SEQ ID NO: 16) (que comprende una supresión en el dominio HA1 de aminoácidos desde la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306 y comprende un conector 4G que reemplaza la parte suprimida en el dominio HA1), también denominado diseño/construcción parental, el polipéptido basado en H1N1 A/Brisbane/07/59 UFV160655 (que comprende una supresión en el dominio HA1 de aminoácidos desde la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306, y no comprende un conector 4G que reemplaza la parte suprimida en el dominio HA1, e incluye las mutaciones puntuales Y392P, R404Q, E434Q y S442A) (SEQ ID NO: 103), mostró claramente niveles mayores de expresión (hasta 40 veces), alcanzando ~500 mg/l de sobrenadante de cultivo (figura 5A).

El polipéptido parental procedente de H1N1 A/California/07/09 UFV5369 (SEQ ID NO: 17) se expresó a un nivel de ~350 mg/l de sobrenadante de cultivo. El polipéptido UFV150558, de diseño similar al polipéptido UFV5369, y que incluye además las mutaciones puntuales Y392P, R404Q, E434Q y S442A (SEQ ID NO: 30) se expresó a un nivel de ~427 mg/l. Los polipéptidos UFV160656 (SEQ ID NO: 104) (que comprende una supresión que comprende los aminoácidos desde la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306 y que no comprende un conector 4G que reemplaza la parte suprimida en el dominio HA1, y que comprende las mutaciones puntuales Y392P, R404Q, E434Q y S442A), UFV160664 (que comprende la misma supresión pero que solo comprende las mutaciones puntuales Y392R y E434Q) (SEQ ID NO: 109) y UFV160665 (que comprende la misma supresión y que comprende las mutaciones puntuales Y392P y E434Q) (SEQ ID NO: 110) se expresaron a un mayor nivel en comparación con 5369, hasta ~800 mg/l de sobrenadante de cultivo (figura 5A).

Con respecto al contenido de trímeros, todos los polipéptidos que comprenden una o más de las mutaciones nuevas adicionales, independientemente de la cadena principal de su cepa, el tamaño de la supresión de la cabeza y la presencia o ausencia del conector 4G que reemplaza la parte suprimida del dominio HA1, alcanzaron niveles por encima del 90 %

que fueron significativamente mayores que los obtenidos para los diseños parentales para los que solo ~25 % de la proteína expresada formó trímeros con éxito (figura 5B).

Se prepararon polipéptidos adicionales que comprendían una mutación del aminoácido en la posición 392 a Y, P o R en combinación con una mutación del aminoácido en la posición 434 a Q, incluyendo UFV160302 (SEQ ID NO: 60) y UFV160303 (SEQ ID NO: 61). El polipéptido UFV160304 (SEQ ID NO: 62) que comprende un diseño similar al polipéptido UFV160302 pero no comprende la mutación puntual Y392R mostró un contenido de trímeros menor (~1.7 veces) (figura 5C).

Tomados juntos, los polipéptidos de la invención descritos en este ejemplo, que comprenden una Y, P o R en la posición 392, en combinación con una Q en la posición 434, presentaron niveles significativamente mayores de expresión de proteínas y contenido de trímeros (porcentaje de trímeros formados con éxito) en comparación con los diseños parentales. La presencia de estos aminoácidos en las posiciones 392 y 434 condujo a una mejora significativa en la expresión, trimerización y estabilidad.

Ejemplo 3: Purificación de polipéptidos triméricos de la invención

Purificación

Los polipéptidos se purificaron por medio de un protocolo de dos etapas. En primer lugar, se cargó el sobrenadante de cultivo recogido y clarificado en una columna HiScale 16/20 (GE Healthcare) empaquetada con una resina de afinidad (Capture Select) que consiste en un dominio sencillo específico de HA inmovilizado en perlas Poros (obtenidas de ThermoFisher Scientific). Esta resina es muy específica para proteínas de hemaglutinina procedentes de la cepa H1. La columna se sobrecargó intencionadamente en ~15 % para mejorar el aislamiento del trímero. Después de la unión y el equilibrado en Tris 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.4, los polipéptidos se eluyeron aplicando un gradiente por etapas hasta Tris 0.1 M, MgCl₂ 2 M, propilenglicol al 40 %, pH 7.4. Basándose en la señal de UV (A280) las fracciones de elución se agruparon y filtraron a través de una membrana de filtro de 0.22 µm Millex-GV (Merck Millipore). Posteriormente, el máximo de elución recogido se aplicó a una columna Superdex 200 pg 26/60 (GE Healthcare) equilibrada en tampón de ejecución (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.8) para fines de pulido, es decir, para retirar la cantidad mínima de proteína multimérica y monomérica. Las fracciones triméricas se agruparon y la pureza se evaluó mediante SEC-MALS analítica en una preparación de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) serie Infinity 1260 (Agilent). De cada polipéptido purificado se procesaron 40 µg (1 ml/min) sobre una columna TSK gel G3000SWxl (Sigma-Aldrich) y la masa molar del material eluido se midió mediante un detector de dispersión de la luz multiangular miniDAWN Treos y refractómetro diferencial Optilab T-rex (Wyatt Technology). Los datos se analizaron mediante el paquete de software Astra 6 y se obtuvieron cálculos de peso molecular a partir de la señal del índice de refracción.

Resultados y conclusión

El perfil de elución de la segunda etapa de purificación (cromatografía de exclusión por tamaño) indicó que estaba presente una gran cantidad de polipéptido no trimérico (agregados y monómero) 5367 en las fracciones de elución agrupadas de la columna de afinidad. Por el contrario, el cromatograma de UFV160656 mostró solo una pequeña cantidad de agregados, mientras que la principal especie presente fue el polipéptido trimérico (figuras 6A y B).

El rendimiento de las construcciones parentales UFV5367 y UFV5369 fue de 5 y 70 mg/l, respectivamente, mientras que los rendimientos para los polipéptidos de la invención variaron de 120 a 240 mg/l. El porcentaje de recuperación, calculado por comparación de la cantidad de proteína presente en el sobrenadante de cultivo y el producto final trimérico, fue de aproximadamente 40-60 %. El análisis de las fracciones triméricas agrupadas mediante SEC-MALS analítica mostró que el material purificado es puro; no se observaron otros picos en la señal de UV (figura 6B). Asimismo, el peso molecular calculado, ~96-106 kDa, correspondió al peso molecular esperado del polipéptido trimérico glucosilado (figura 6C).

Los datos anteriores indicaron que se logró purificación de los polipéptidos mediante un protocolo de 2 etapas sencillo que da lugar a proteína trimérica muy pura con alta eficacia y produce bastante más de 100 mg/l de sobrenadante de cultivo.

Ejemplo 4: Caracterización de trimerización de polipéptidos de la invención mediante cromatografía de exclusión por tamaño en presencia de fragmentos Fab de unión

Caracterización

El plegamiento y la estabilidad térmica de los polipéptidos purificados se evaluó mediante (i) análisis de SEC-MALS en presencia de fragmentos Fab, (ii) mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y (iii) mediante fluorimetría de exploración diferencial (DSF).

La unión en solución de fragmentos Fab con los polipéptidos de la invención (también denominados "proteínas mini-HA") se supervisó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y análisis de dispersión de la luz multiangular (MALS) usando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (Agilent) e instrumento miniDAWN TREOS acoplado a un detector de índice refractario Optilab T-rEX (Wyatt Technology). En total, se aplicaron 40 µg del polipéptido o fragmentos Fab de mAb CR6261, CR9114 y un anticuerpo de control negativo a una columna TSK-Gel G3000SWxl (Sigma Aldrich)

equilibrada en tampón de ejecución (NaPi 150 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0). La formación de complejos se verificó mediante análisis de los polipéptidos incubados en presencia de un exceso molar de 1.2 veces de fragmentos Fab. Los datos se analizaron mediante el paquete de software Astra 6 y se obtuvieron cálculos de peso molecular a partir de la señal del índice de refracción.

5 La avidéz de la unión de CR6261 y CR9114 con los polipéptidos se evaluó mediante mediciones de interferometría de biocapa usando un Octet RED384 (ForteBio). Se inmovilizaron anticuerpos biotinilados en biosensores Dip and Read de estreptavidina (SA) para cinética (ForteBio). Se midieron curvas de unión en tiempo real aplicando el sensor en una serie de diluciones dobles del polipéptido en tampón cinético concentrado 10x diluido en PBS (ForteBio). Las concentraciones de partida de los polipéptidos estaban en el intervalo de 0.15-10 nM. Se determinaron las constantes de disociación (KD) usando análisis de estado estacionario, suponiendo un modelo de unión 1:1 para bnAb con los polipéptidos.

Además, se evaluó la unión de anticuerpos y anticuerpos de un solo dominio (SD) con los polipéptidos de tallo de la invención mediante ELISA. En primer lugar, se recubrió con 50 µg por pocillo de la proteína la superficie de placas de alta unión OptiPlate-96 (Perkin Elmer) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de incubación durante una noche a 4 °C, lavado (tres veces con PBS + Tween-20 0.05 %), bloqueo (1.5 horas a temperatura ambiente con PBS + Tween-20 0.05 % + albúmina de suero bovino 1 %) y lavado (tres veces con PBS + Tween-20 0.05 %), las placas se incubaron durante 1 hora a TA con el mAb y SD en una serie de diluciones triples con una concentración de partida de 70 nM o 100 nM respectivamente. Después de otro lavado (tres veces con PBS + Tween-20 0.05 %), la peroxidasa de rábano picante conjugada con IgG de ratón antihumano (Jackson) se añadió en una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo (PBS + Tween-20 0.05 % + albúmina de suero bovino 1 %). Después de otra hora de incubación a TA y lavado posterior (tres veces con PBS + Tween-20 0.05 %), se añadió sustrato de ELISA de quimioluminiscencia BM (Roche) y después de una incubación de 15 minutos se midió la señal luminiscente usando un lector de placas Synergy Neo (Perkin Elmer). Los valores de concentración eficaz semimáxima (CE₅₀) se calcularon mediante el conjunto Spotfire (Tibco Software Inc.). La CE₅₀ se correlaciona directamente con la fuerza de unión del anticuerpo respectivo y, por lo tanto, una medida de la calidad del antígeno, es decir, su plegamiento y estabilidad adecuados.

25 La termoestabilidad de la proteína se determinó mediante DSF a través de supervisión de la emisión fluorescente de la solución del polipéptido (6 µg) en presencia de colorante naranja Sypro 5x (ThermoFisher Scientific). Tras el aumento gradual de la temperatura, de 25 °C a 95 °C (60 °C por hora), los polipéptidos se despliegan y el colorante fluorescente se une con los restos hidrófobos expuestos. Las curvas de fusión se midieron usando una máquina de PCR en tiempo real ViiA7 (Applied BioSystems) y los valores de Tm₅₀ se calcularon mediante el conjunto Spotfire (Tibco Software Inc.). Los valores de Tm₅₀ representan la temperatura a la que 50 % de la proteína se despliega y, por tanto, son una medida de la termoestabilidad de los polipéptidos. Adicionalmente, también se determinó la desnaturalización inducida por calor mediante DSC en el que el punto medio de transición térmica (Tm) se determinó supervisando la diferencia en el aporte de energía entre la muestra y la célula de referencia usando un sistema MacriCal DSC (Malvern). A una concentración de 1 mg/ml, las muestras se calentaron gradualmente, de 20 °C a 90 °C (100 °C por hora), y las series se analizaron mediante el software Origin (Malvern). Basándose en los diagramas de temperatura (°C) frente a capacidad térmica (kcal/mol/°C) se calcularon los valores de Tm.

Resultados y conclusión

El peso molecular teórico de los polipéptidos triméricos basado en aminoácidos solo es de ~90 kDa, sin embargo, ya que cada proteína contiene 5 motivos de glucosilación ligados a N (NxT/S), el peso molecular será mayor cuando se produzca en un sistema de expresión de mamífero. Se calculó que los pesos moleculares como se determinan mediante análisis de SEC-MALS estaban en el intervalo de 96-106 kDa lo que indica que las proteínas están, como se esperaba, significativamente glucosiladas (tabla 1).

45 **Tabla 1.** Peso molecular de los polipéptidos de la invención (segunda columna) y de los polipéptidos en complejo con los fragmentos Fab de bnAb CR6261 y CR9114 (tercera y cuarta columna) según lo determinado por SEC-MALS usando la señal para el índice refractario. El peso molecular (PM) de Fab6261 y Fab9114 se determinó a ~44 kDa.

ID del polipéptido	PM del polipéptido (kDa)	PM del polipéptido + Fab6261 (kDa)	PM del polipéptido + Fab9114 (kDa)
UFV5367	98	204	228
UFV160655	96	204	225
UFV5369	97	212	225
UFV160656	103	217	235
UFV160664	98	211	226
UFV160665	106	235	254

La unión del anticuerpo con los polipéptidos indica el plegamiento correcto de los polipéptidos y la presencia de epítomos plegados correctamente de los anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAb). Se evaluó en solución la unión de fragmentos Fab CR9114, CR6261 y un Fab sin unión (control negativo) mediante análisis de SEC-MALS, como se ha descrito anteriormente. Tras la unión del fragmento Fab con el polipéptido, el aumento de peso molecular dará lugar a un desplazamiento de máximo visible (tiempo de retención acortado) en la SEC. Asimismo, la supervisión de la señal de MALS permite el cálculo del peso molecular del complejo formado. Como se había anticipado, el fragmento Fab usado como control negativo no se unió; es decir, no se observó desplazamiento de pico del polipéptido tras la adición del fragmento Fab (figura 7A). Por el contrario, se observó un desplazamiento de pico evidente a un tiempo de retención más corto tras la incubación con los otros dos fragmentos Fab (figuras 7B y C). Asimismo, la determinación del peso molecular del complejo indicó que el polipéptido se une con 3 fragmentos Fab (tabla 1), lo que confirma que los tres monómeros en el polipéptido trimérico están plegados adecuadamente y son accesibles para los anticuerpos.

Para evaluar adicionalmente la calidad y el plegamiento de los polipéptidos, se determinó la constante de disociación (K_D) de los bnAb, se determinó la unión de CR6261 y CR9114 mediante interferometría de biocapa (tabla 2). Para todos los polipéptidos, la avidéz de unión estaba por debajo de 1 nM, lo que indica que los polipéptidos triméricos representan la superficie de tallo de HA nativo.

Tabla 2. Unión de CR6261 y CR9114 a polipéptidos de tallo de la invención. Valores de K_D de unión de CR6261 y CR9114 según lo determinado mediante interferometría de biocapa y análisis de estado estacionario. Se añadió HA H1N1 A/Brisbane/59/07 de longitud completa para comparación.

ID del polipéptido	K_D (nM)	
	CR6261	CR9114
HA Brisbane	1.1	0.71
UFV5367	0.48	0.45
UFV160655	0.55	0.49
UFV5369	0.97	0.56
UFV160656	0.60	0.54
UFV160664	0.57	0.46
UFV160665	0.56	0.39

5 Asimismo, se evaluó la unión de anticuerpos mediante ELISA. En función de las curvas S se calcularon los valores de CE_{50} que confirmaron el plegamiento apropiado de los polipéptidos. Ambos anticuerpos se unieron muy fuertemente con valores de CE_{50} inferiores a 1 nM (tabla 3).

Tabla 3. Fuerza de unión de anticuerpos con los polipéptidos purificados según lo determinado por ELISA (valores de CE_{50} promedio en nM de las curvas S de 3 ensayos independientes).

ID del polipéptido	CR6261	CR9114
UFV5367	0.417	0.410
UFV160655	0.396	0.400
UFV5369	0.391	0.389
UFV160656	0.432	0.410
UFV160664	0.395	0.379
UFV160665	0.425	0.409

10 La estabilidad térmica es una medida de la resistencia de los polipéptidos cuando se exponen a tensión y, por tanto, de la estabilidad de los polipéptidos. Los polipéptidos de la invención se calentaron gradualmente en presencia de un colorante fluorescente que, a lo largo del experimento, se une con la proteína que se despliega y el cambio resultante de la intensidad de fluorescencia se usó para calcular los valores de T_{m50} (tabla 4). Aunque los diseños parentales (UFV5367 y UFV5369) presentaron un valor de T_{m50} de ~ 52 y ~ 57 °C, respectivamente, resulta sorprendente que los polipéptidos de la invención presentaron valores que son significativamente mayores (hasta ~ 7 °C), lo que indica una estabilidad significativamente mejorada. Se observó una diferencia similar entre los diseños parentales y los polipéptidos de la invención para los valores de T_m según lo determinado por DSC. En general, los valores de T_m (DSC) fueron ~ 2 °C mayores que los valores de T_{m50} (DSF) lo que se debió a la diferencia en la manera en que se determinan estos valores; para DSC, se determinó la temperatura en el pico máximo, mientras que para DSF la temperatura se determinó a alturas de pico $\frac{1}{2}$.

15 20 **Tabla 4.** Visión de conjunto de valores de T_{m50} de los polipéptidos purificados según lo determinado por DSF y DSC.

ID del polipéptido	T_{m50} (°C)	
	DSF	DSC
UFV5367	51.8 ± 0.09	-
UFV160655	58.5 ± 0.21	-
UFV5369	57.2 ± 0.08	59.1 ± 0.01

ID del polipéptido	Tm ₅₀ (°C)	
	DSF	DSC
UFV160656	64.1 ± 0.14	66.2 ± 0.07
UFV160664	63.3 ± -0.12	65.3 ± 0.01
UFV160665	62.5 ± 0.16	65.2 ± 0.16

5 El peso molecular de los polipéptidos, la unión del fragmento Fab observado en solución y la unión fuerte de los Ab indicaron que los diseños parentales y los polipéptidos de las invenciones son triméricos y están bien plegados. Asimismo, como se indica por los valores de Tm₅₀/Tm calculados, los polipéptidos de la invención fueron considerablemente más resistentes a la tensión térmica en comparación con los diseños parentales. Tomados en su conjunto, los datos de unión y los datos de termoestabilidad indican que los polipéptidos de la invención son triméricos en solución, se pliegan de manera adecuada (3 epítomos) y presentan estabilidad térmica significativamente mejorada en comparación con sus diseños parentales.

Ejemplo 5: Supresiones alternativas, conectores y secuencias de dominio de cabeza según la invención

Diseños

10 Los polipéptidos de tallo de hemaglutinina de la gripe (HA) descritos anteriormente se obtuvieron de HA de longitud completa suprimiendo una parte del dominio HA1 que comprende los aminoácidos de la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306. No se introdujo ninguna secuencia conectora. En los diseños parentales, la supresión comprendía los aminoácidos 46-306 y los dos extremos HA1 después de la supresión se conectaron mediante un "conector GGGG" artificial (figura 8).

15 En este ejemplo, se exploraron posiciones de corte alternativas adicionales de la cabeza y conectores homólogos alternativos. La tabla 5 muestra posiciones de corte alternativas para la retirada del dominio de cabeza HA1. Los extremos de HA1 en el diseño parental están indicados en gris. La construcción UFV160360 (SEQ ID NO: 63) comprende una supresión desde el aminoácido en la posición 46 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306 y un conector 4G que reemplaza la parte suprimida en el dominio HA1, y comprende además las mutaciones puntuales Y392P, R404Q, E434Q y S442A. Se prepararon nuevas construcciones en donde se incluyeron hasta 7 restos de aminoácidos adicionales del dominio HA1 (HA1 arriba), el primer (N-terminal) dominio HA1 y hasta 4 restos de aminoácidos adicionales de la hebra abajo de HA1 (el segundo dominio HA1 o dominio HA1 C-terminal) o se suprimieron hasta 2 restos de aminoácidos, variando de este modo el tamaño de la supresión de cabeza. Estas construcciones también comprendían todas las mutaciones puntuales Y392P, R404Q, E434Q y S442A.

25 **Tabla 5:** Supresiones de dominio de cabeza alternativas, véase también figura 5). El * indica la mutación de una cisteína libre (C) a una G. Los números de las posiciones de aminoácidos indican la posición de aminoácido según la convención de numeración de H3.

	N.º de UVF	HA1 arriba														Supresiones de dominio de cabeza										HA1 abajo			
A/Brisbane/59/07		N	L	L	E	N	S	H	N	G	K				...	I	G	K	C	P	K	Y	V	K					
A/California/07/09		N	L	L	E	D	K	H	N	G	K	L	C	K	...	I	G	E	C	P	K	Y	V	R					
UFV160360		N	L	L	E	D	G	G	G	G												K	Y	V	C				
N.º de posición de AA		41	42	43	44	45	46	47	48	48	50	51	52	53		302	303	304	305	306	307	308							
UFV160361		N	L	L	E	D																K	Y	V	C				
UFV160362		N	L	L	E	D	K															K	Y	V	C				
UFV160363		N	L	L	E	D	K	H														K	Y	V	C				
UFV160364		N	L	L	E	D	K	H	N													K	Y	V	C				
UFV160365		N	L	L	E	D	K	H	N	G												K	Y	V	C				
UFV160366		N	L	L	E	D	K	H	N	G	K											K	Y	V	C				

Ejemplo 6: Variaciones de sitio de escisión de HA1/HA2: sitio de escisión de inactivación, monobásico y polibásico

La escisión de la proteína HA0 de la gripe (en HA1 y HA2) es necesaria para su actividad, facilitando la entrada del genoma vírico en las células diana al provocar la fusión de la membrana del hospedador con la membrana vírica. Todos los polipéptidos de la invención descritos anteriormente se expresaron con la mutación de inactivación del sitio de escisión R329Q para prevenir la escisión potencial de la molécula durante la producción *in vitro* y/o *in vivo*.

- 5 En este ejemplo, se expresaron varios polipéptidos de tallo con el sitio de escisión monobásico natural o que incluían un sitio de escisión polibásico, p. ej., un sitio de escisión de furina (tabla 7). Los polipéptidos también comprendían las mutaciones en la posición 392 y 434.

Tabla 7. Variantes de sitio de escisión.

ID del polipéptido	Sitio de escisión	Secuencia
UFV150850	Inactivado	R329Q
UFV160302	Monobásico	R329 (tipo silvestre)
UFV160301	Polibásico	RRRKK
UFV160503	Polibásico	RKRR

Análisis de sobrenadante de cultivo

- 10 Se sintetizaron fragmentos de ADN que codificaban los polipéptidos enumerados en la tabla 7 como se ha descrito en el ejemplo 5.

El nivel de polipéptido expresado en el sobrenadante de cultivo recogido se evaluó mediante interferometría de biocapa usando la plataforma OCTET. En resumen, se inmovilizó el mAb biotinilado CR9114 en biosensores de estreptavidina (SA) (Pall FortéBio) después de lo cual se estableció una curva patrón evaluando el desplazamiento de unión de una serie de diluciones de un polipéptido homólogo purificado bien definido. Posteriormente, se midió el desplazamiento de unión de sobrenadante de cultivo recogido prediluido que contiene el polipéptido (5-15 µg/ml diluidos en tampón de cinética) y se calculó la concentración usando la curva de referencia establecida.

- 15

Resultados y conclusión

- 20 No se observó ningún efecto en el nivel de expresión para los polipéptidos en los que se insertó un sitio de escisión monobásico (R) o polibásico (RRRKK), es decir, UFV160302 y UFV160301, respectivamente (figura 10). Ambos polipéptidos se expresaron a niveles similares y mostraron niveles similares de contenido de trímeros en comparación con el polipéptido de referencia UFV150850, que es resistente a escisión por proteasa mediante mutación del aminoácido en la posición 329 a Q.

- 25 Para el segundo sitio de escisión polibásico introducido (RKRR), se observó una reducción de ~2 veces del nivel de expresión y contenido de trímeros (UFV160503).

Ejemplo 7: Secuencias ilustrativas de GCN4 o dominios de trimerización de repeticiones de héptadas alternativos

Diseños

- 30 En los polipéptidos de la invención como se han descrito anteriormente, el extremo N-terminal de la hélice C (parte superior de la molécula, véase figura 1C), en particular la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 419 del dominio HA2, se reemplazó por el dominio de trimerización GCN4 de la SEQ ID NO: 113 para mejorar la tendencia de trimerización de la molécula. En este ejemplo, las optimizaciones de la interfaz superenrolladas se exploraron con éxito mediante optimización de la secuencia de repetición de héptada de la hélice C. La tabla 8 muestra una secuencia de trimerización en el polipéptido UFV160090 (SEQ ID NO: 56). Las mutaciones en la región N-terminal de la hélice C se destacan en gris claro. La secuencia de trimerización de UFV160097 (SEQ ID NO: 58) es idéntica a los polipéptidos como se han descrito en el ejemplo 1. Las diferencias de la secuencia de repetición de héptada en la parte N-terminal de la hélice C con la HA de tipo silvestre se destacan en gris.

- 35

Tabla 8: Secuencias de GCN4 o dominios de trimerización de repeticiones de héptadas alternativos (para polipéptidos procedentes de HA A/California/07/09). Los números en la parte superior indican la posición de aminoácido según la convención de numeración de H3.

Dominio de trimerización de hélice C	N.º de UFV	Hélice C (posición de aminoácido de la región N-terminal)														
		405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419
A/California/07/09 ts	ts	R	I	E	N	L	N	K	K	V	D	D	G	F	L	D

Dominio de trimerización de hélice C	N.º de UFV	Hélice C (posición de aminoácido de la región N-terminal)														
		405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419
GCN4	160097	C	M	K	Q	I	E	D	K	I	E	E	I	E	S	K
repetición de héptada alternativa	160090	C	I	E	A	K	E	K	K	V	D	D	I	E	K	K

Análisis de sobrenadante de cultivo

Se sintetizaron fragmentos de ADN que codificaban los polipéptidos enumerados en la tabla 8 como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 5.

5 Todas las evaluaciones en los sobrenadantes de cultivo recogidos se realizaron mediante AlphaLISA similar a lo descrito para el ejemplo 5. Los datos de unión de CR9114 se normalizaron en el nivel de expresión.

Resultados y conclusión

10 La evaluación por AlphaLISA de los sobrenadantes de cultivo recogidos sobre el nivel de expresión del polipéptido, contenido de trímeros y unión de CR9114 indicaron que se toleraba una optimización alternativa de la interfaz del trímero de hélice C (es decir, distinta de la repetición de tipo GCN4, como está presente en los polipéptidos descritos anteriormente). Se observó un nivel de expresión de proteínas mejorado (~2 veces), aunque se observó una reducción del contenido de trímeros (~2 veces). No se vio afectada la unión de CR9114 (figura 11).

Ejemplo 8: *Truncamientos alternativos en el extremo C de los polipéptidos tallo de la invención*

Diseños

15 La hemaglutinina es una proteína de membrana que está localizada en la superficie de la partícula vírica con la parte C-terminal de la proteína incluida en la membrana vírica. Para las versiones solubles de los polipéptidos de la invención, el dominio transmembrana se suprimió mediante un truncamiento en el inicio del dominio transmembrana (TM). Adicionalmente, también se evaluaron posiciones de truncamiento alternativas (tabla 9 y 10).

20 **Tabla 9.** Truncamientos alternativos del extremo C del dominio HA2 (para polipéptidos procedentes de HA A/Brisbane/59/07). Los números en la parte superior indican la posición de aminoácido según la convención de numeración de H3.

N.º de UFV	La posición y secuencia de aminoácidos del extremo C de diseños de mini-HA solubles en comparación con ts																				TM dominio			
	49 6	49 7	49 8	49 9	50 0	50 1	50 2	50 3	50 4	50 5	50 6	50 7	50 8	50 9	51 0	51 1	51 2	51 3	51 4	51 5	51 6	51 7	51 8	51 9
A/Brisbane/59/07	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV5367	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I				
UFV150565	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV150566	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I	L	A		
UFV150567	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y						
UFV150568	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G								
UFV150569	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S										
UFV150570	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L												
UFV150571	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V														
UFV150572	K	L	N	R	E	K	I	D																
UFV150573	K	L	N	R	E	K																		

N.º de UVF	La posición y secuencia de aminoácidos del extremo C de diseños de mini-HA solubles en comparación con ts																TM dominio							
	49 6	49 7	49 8	49 9	50 0	50 1	50 2	50 3	50 4	50 5	50 6	50 7	50 8	50 9	51 0	51 1	51 2	51 3	51 4	51 5	51 6	51 7	51 8	51 9
UFV150574	K	L	N	R																				

Tabla 10. Truncamiento del extremo C del dominio HA2 (para polipéptidos procedentes de HA A/California/07/09). Los números en la parte superior indican la posición de aminoácido según la convención de numeración de H3.

N.º de UVF	La posición y secuencia de aminoácidos del extremo C de diseños de mini-HA solubles en comparación con ts																TM Dominio							
	49 6	49 7	49 8	49 9	50 0	50 1	50 2	50 3	50 4	50 5	50 6	50 7	50 8	50 9	51 0	51 1	51 2	51 3	51 4	51 5	51 6	51 7	51 8	51 9
A/California/07/09	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV5369	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I				
UFV150575	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV150576	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I	L	A		
UFV150577	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y						
UFV150578	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R								
UFV150579	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S										
UFV150580	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L												
UFV150581	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V														
UFV150582	K	L	N	R	E	E	I	D																
UFV150583	K	L	N	R	E	E																		
UFV150584	K	L	N	R																				

Análisis de sobrenadante de cultivo

5 Se sintetizaron fragmentos de ADN que codificaban los polipéptidos enumerados en la tabla 9 y tabla 10 como se ha descrito en el ejemplo 5.

10 Los sobrenadantes de cultivo recogidos se analizaron para determinar la presencia de polipéptido expresado mediante transferencia de Western. Las muestras se procesaron en un gel de SDS-PAGE, Bis-Tris al 4-12 % (ThermoFisher Scientific) en condiciones no reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF usando el sistema iBlot id 2.0 (ThermoFisher Scientific). Para visualización de las bandas correspondientes a los polipéptidos la membrana se bloqueó con agente de bloqueo al 0.2 % (leche en polvo – BioRad) en TBST antes de la incubación con las proteínas de hemaglutinina derivadas específicas de cepa H1 y anticuerpo de un solo dominio (gripe 6) con dilución suficiente en tampón de bloqueo. Después del lavado (TBST) la membrana se incubó con estreptavidina marcada con HRP (Becton Dickinson dilución 1:250 en tampón de bloqueo). Posteriormente, después de otra etapa de lavado (TBST) las bandas de proteínas se visualizaron mediante incubación con sustrato de peroxidasa Trueblue (KPL).

15 La unión del anticuerpo monoclonal ampliamente neutralizante CR9114 con los polipéptidos expresados de la invención se evaluó en el sobrenadante de cultivo recogido mediante interferometría de biocapa usando la plataforma OCTET. En resumen, los sobrenadantes diluidos dobles en tampón de cinética (Pall FortéBio) se evaluaron mediante biosensores de estreptavidina (SA) (Pall FortéBio) cargados con CR9114 biotinilado. Se realiza ajuste de curva durante los 20 segundos iniciales de la etapa de asociación para calcular los valores de K_{on} ; la concentración de los polipéptidos en los

sobrenadantes de cultivo se estableció en 50 mM y las curvas se ajustaron en un modelo 1:1. Se incluyó una muestra simulada como control negativo.

Resultados y conclusión

5 Se observó un efecto mínimo de los truncamientos C-terminales alternativos en el nivel de expresión de los polipéptidos. Todas las variantes, excepto UFV150565 y UFV150574, presentaron una banda evidente en la altura trimérica en el análisis de transferencia de Western de sobrenadantes de cultivo recogido (figura 12A).

10 El análisis de Octet indicó que casi todos los diseños (excepto UFV150575) se unieron con el CR9114 inmovilizado (figura 12B), aunque se observaron valores de K_{on} menores en general para las variantes C-terminales en comparación con los diseños de referencia 5367 y 5369. Esto probablemente se debió, parcialmente, al procedimiento de ajuste de curva básico suponiendo concentración de proteínas idéntica para todos los diseños; sin embargo, la unión del polipéptido con el anticuerpo es evidente.

Los resultados muestran claramente que son posibles truncamientos hasta la posición 502.

Ejemplo 9: *Enlaces disulfuro interprotoméricos; posiciones alternativas*

Diseños

15 Los polipéptidos de la invención se purifican del sobrenadante de cultivo como proteínas triméricas covalentes. En los polipéptidos como se han descrito anteriormente, el enlace covalente se ha establecido mediante la introducción de dos restos de cisteína, en el bucle B (posición 397) y hélice C (posición 405), que forman un enlace disulfuro emparejando con el resto de cisteína en el monómero adyacente (enlace disulfuro intermonomérico). En este ejemplo, se exploraron dos posiciones alternativas para estos enlaces disulfuro interprotoméricos (tabla 11).

20 **Tabla 11.** Posiciones alternativas para los restos de cisteína que forman enlaces disulfuro interprotoméricos. * Motivo de glucano ligado a N inactivado (NxS) en la posición 400.

ID del polipéptido	Introducción de cisteína en la posición de aminoácido	Cepa de virus de la gripe parental
UFV160090	397 + 405	H1N1 A/California/07/09
UFV160093	398 + 405	H1N1 A/California/07/09
UFV160088*	396 + 408	H1N1 A/Brisbane/59/07

Análisis de sobrenadante de cultivo

Se sintetizaron fragmentos de ADN que codificaban los polipéptidos como se ha descrito anteriormente.

25 Todas las evaluaciones en los sobrenadantes de cultivo recogidos se realizaron mediante AlphaLISA como se ha descrito en el ejemplo 7.

Resultados y conclusión

30 La evaluación de AlphaLISA de los sobrenadantes de cultivo recogidos sobre el nivel de expresión del polipéptido, el contenido de trímeros y la unión de CR9114 indicó que los enlaces disulfuro interprotoméricos alternativos presentaron uno similar o mejor que el polipéptido de referencia UFV160090 (figura 13). Estos datos indicaron que la introducción de restos de cisteína en las posiciones 398 y 405 (UFV160093) y 396 y 408 (UFV160088) proporcionaban una alternativa al enlace disulfuro interprotomérico formado por las cisteínas introducidas en las posiciones 397 y 405 (UFV160090).

Ejemplo 10: *Protección contra exposición letal a H1N1 A/Brisbane/59/07 después de la inmunización de ratones sin exposición previa a polipéptidos de la invención*

35 En este ejemplo, se evaluó la eficacia protectora (basada en la proporción de supervivencia al final del periodo de seguimiento) de un intervalo de dosis de UFV160664 con Al(OH)₃ como adyuvante en comparación con animales inmunizados de forma simulada (PBS) y con una dosis fija de UFV4900 (exploratoria).

40 Se inmunizaron grupos de 8-11 ratonas BALB/c (6-8 semanas de edad) por vía intramuscular 2 veces en un intervalo de 3 semanas con un intervalo de dosis de UFV160664 trimérico soluble con 50 µg de Al(OH)₃ como adyuvante (formulado como Alyhydrogel al 2 %). El intervalo de dosis consistió en 4 diluciones 10 veces desde 30 µg hasta 0.03 µg. Como control positivo para el modelo de exposición se inmunizaron ratones dos veces con 30 µg de UFV4900 soluble trimérico

(n=10), mientras que 2 inmunizaciones con PBS actuaron como un control negativo (n=11). Cuatro semanas después de la última inmunización, se tomaron muestras de sangre de ratones para analizar la respuesta inmunitaria (ELISA de HA de longitud completa (FL) H1N1 A/Brisbane/59/07) y un día después los ratones se expusieron a 25xDL50 virus de exposición H1N1 A/Brisbane/59/07 adaptado a ratón y se supervisaron (supervivencia, peso, puntuaciones clínicas) durante 3 semanas. La proporción de supervivencia al final del seguimiento fue el parámetro de resultado primario.

Resultados

Se mostró que UFV160664 con AIOH₃ como adyuvante era inmunogénico ya que los títulos de ELISA de HA FL H1N1 A/Brisbane/59/07 aumentaron significativamente ($P < 0.001$; prueba de U de Mann-Whitney con ajuste por etapas, comenzando a la dosis mayor y de Bonferroni para múltiples comparaciones) en comparación con el grupo de PBS para todas las dosis probadas. Los títulos de los animales inmunizados con dosis de 30 µg de UFV160664 fueron similares a los del grupo de 30 µg de UFV4900 (figura 15).

Además, UFV160664 con AIOH₃ como adyuvante proporcionó protección significativa ($P \leq 0.003$; prueba exacta de Fisher, corrección de Bonferroni sobre construcciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis mayor) para todas las dosis, excepto 0.03 µg, en comparación con el grupo de PBS. La proporción de supervivencia del grupo de 30 µg de UFV160664 (87.5 %) fue similar a la del grupo de 30 µg de UFV4900 (90 %) (figura 16; panel superior). La pérdida de peso (definida por el área bajo la curva) se redujo significativamente ($P \leq 0.012$; ANOVA, corrección de Bonferroni doble sobre construcciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis mayor) para todas las dosis, excepto 0.03 µg, en comparación con el grupo de PBS. La pérdida de peso del grupo de 30 µg de UFV160664 fue similar a la del grupo de 30 µg de UFV4900 (figura 16; panel inferior).

Conclusión

Según la presente invención, se ha mostrado que UFV160664 con AIOH₃ como adyuvante es inmunogénico y proporciona protección en un modelo de exposición de ratón a H1N1 A/Brisbane/59/07 letal. La inmunogenicidad y eficacia protectora es similar a UFV4900 con AIOH₃ como adyuvante.

Ejemplo 11: *Protección contra exposición letal a H1N1 A/Puerto Rico/8/34 después de la inmunización de ratones sin exposición previa a polipéptidos de la invención*

En este ejemplo, se evaluó la eficacia protectora (basada en la proporción de supervivencia al final del periodo de seguimiento) de un intervalo de dosis de UFV160664 con Adjuvlex al 2 % como adyuvante en comparación con animales inmunizados de forma simulada (PBS) y con una dosis fija de UFV4900 (exploratoria).

De nuevo, se inmunizaron grupos de 8-11 ratonas BALB/c (6-8 semanas de edad) por vía intramuscular 2 veces en un intervalo de 3 semanas con un intervalo de dosis de UFV160664 trimérico soluble con Adjuvlex al 2 % (v/v). El intervalo de dosis consistió en 4 diluciones 10 veces desde 30 µg hasta 0.03 µg. Como control positivo para el modelo de exposición se inmunizaron ratones dos veces con 30 µg de UFV4900 soluble trimérico (n=10), mientras que 2 inmunizaciones con PBS actuaron como un control negativo (n=11). Cuatro semanas después de la última inmunización, los ratones se expusieron a 12.5xDL50 de virus de exposición H1N1 A/Puerto Rico/8/34 adaptado a ratón y se supervisaron (supervivencia, peso, puntuaciones clínicas) durante 3 semanas. La proporción de supervivencia al final del seguimiento fue el parámetro de resultado primario.

Resultados

Se mostró que UFV160664 con Adjuvlex al 2 % como adyuvante proporcionó protección significativa ($P \leq 0.003$; prueba exacta de Fisher, corrección de Bonferroni sobre construcciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis mayor) para todas las dosis, excepto 0.03 µg, en comparación con el grupo de PBS. La proporción de supervivencia del grupo de 30 µg de UFV160664 (100 %) fue similar a la del grupo de 30 µg de UFV4900 (100 %) (figura 17; panel superior).

La pérdida de peso (definida por el área bajo la curva) se redujo significativamente ($P \leq 0.026$; ANOVA, corrección de Bonferroni doble sobre construcciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis mayor) para todas las dosis, en comparación con el grupo de PBS. La pérdida de peso del grupo de 30 µg de UFV160664 fue similar a la del grupo de 30 mg de UFV4900 (figura 17; panel inferior).

Conclusión

Según la presente invención, se ha mostrado que UFV160664 con Adjuvlex al 2 % como adyuvante proporciona protección en un modelo de exposición de ratón a H1N1 A/Puerto Rico/8/34 letal. La eficacia protectora es similar a UFV4900 con Adjuvlex al 2 % como adyuvante.

Ejemplo 12: *Los polipéptidos de la invención son inmunogénicos y muestran eficacia similar en relación con una vacuna habitual en un modelo de exposición de hurón sin exposición previa a H1N1 A/Netherlands/602/09*

En este ejemplo, se evaluó la inmunogenicidad *in vivo* y eficacia protectora (basada en la carga vírica pulmonar al final del seguimiento) de dos dosis de UFV160664 en comparación con animales inmunizados solo con adyuvante y con una

vacuna de la gripe de temporada habitual en un modelo de exposición de hurón sin exposición previa a H1N1 A/Netherlands/602/09.

5 Se inmunizaron grupos (n=6) de huronas sin exposición previa por vía intramuscular tres veces, con 3 semanas de diferencia, con 50 o 5 µg de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante. Un grupo de control negativo se inmunizó solo con adyuvante. Un grupo de referencia que representa el tratamiento habitual se inmunizó con una vacuna de la gripe de temporada habitual (SoC, *Standard-of-Care*) disponible en el mercado. Cuatro semanas después de la inmunización final, los animales se expusieron por vía intratraqueal a 10⁶ DICT50 de H1N1 A/Netherlands/602/09 el día 0. Durante el periodo de seguimiento de 4 días, se registraron varios parámetros virológicos y clínicos.

Resultados

10 Se mostró que ambas dosis de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante inducían títulos de anticuerpos específicos de HA H1 A/California/07/09 significativamente mayores en comparación con los títulos del grupo solo con adyuvante (P<0.001; ANOVA censurado, con prueba de la *t a posteriori*. Corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta), mientras que la SoC no (figura 18). Ambas dosis de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante indujeron títulos de anticuerpos específicos de HA H1
15 A/California/07/09 en comparación con los títulos de grupos solo con adyuvante (P<0.001; ANOVA censurado, con prueba de la *t a posteriori*, corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta), mientras que la SoC no (figura 18).

Además, ambas dosis de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante indujeron títulos de anticuerpos específicos de tallo de HA H1 A/California/07/09 (medidos con un ensayo de competición de CR9114) en comparación con los títulos de grupos solo con adyuvante (P<0.001; ANOVA censurado, con prueba de la *t a posteriori*, corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta), mientras que la SoC no (figura 19).
20

La dosis de 50 µg de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante y SoC redujeron significativamente la carga vírica pulmonar en comparación con los títulos de grupo solo con adyuvante (50 µg de UFV160664: P<0.001, SoC: P<0.05; ANOVA censurado, con prueba de la *t a posteriori*, corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta) (figura 20).
25

Conclusión

Según la presente invención, se ha mostrado que ambas dosis de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante son inmunogénicas y que la dosis de 50 µg proporciona protección comparable a la del grupo de referencia de vacuna SoC.

30 **Ejemplo 13:** *Los polipéptidos de la invención muestran eficacia similar en relación con un control positivo en un modelo de exposición de hurón sin exposición previa a H5N1 A/Indonesia/05/05*

En este ejemplo, se evaluó la inmunogenicidad *in vivo* y eficacia protectora (basada en la carga vírica pulmonar al final del seguimiento) de dos dosis de UFV160664 en comparación con animales inmunizados solo con adyuvante y con un grupo de control positivo, inmunizado con HA FL H5 homóloga de la cepa de exposición (exploratoria) en un modelo de exposición de hurón sin exposición previa a H5N1 A/Indonesia/05/05 heterosubtipo.
35

Se inmunizaron grupos (n=6) de huronas sin exposición previa por vía intramuscular tres veces, con 3 semanas de diferencia, con 50 o 5 µg de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante. Un grupo de control negativo se inmunizó solo con adyuvante. Un grupo de control positivo se inmunizó con HA H5 A/Indonesia/05/05 con Adjuvax al 5 % como adyuvante, homóloga de la cepa de exposición. Cuatro semanas después de la inmunización final, los animales se expusieron por vía intratraqueal a 10⁵ DICT50 de H5N1 A/Indonesia/05/05 el día 0. Durante el periodo de seguimiento de 5 días, se registraron varios parámetros virológicos y clínicos.
40

Resultados

Se mostró que los animales inmunizados con ambas dosis de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante y el grupo de control positivo sobrevivió al periodo de seguimiento, mientras que la proporción de supervivencia del grupo solo con adyuvante fue de 25 % (figura 21). La pérdida de peso corporal acumulada durante el seguimiento se redujo para cuatro de 6 animales inmunizados con 50 µg de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante en comparación con el grupo solo con adyuvante. El grupo de control positivo tuvo reducción similar de la pérdida de peso corporal a los cuatro animales del grupo de 50 µg de UFV160664 y la reducción de la pérdida de peso corporal fue significativamente menor en comparación con el grupo solo con adyuvante (P<0.001; ANOVA, con prueba de la *t a posteriori*, corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta) (figura 22).
45

Tanto el grupo de 50 µg de UFV160664 con Adjuvax al 5 % como adyuvante como el grupo de control positivo redujeron significativamente la carga vírica pulmonar en comparación con el grupo solo con adyuvante (50 µg de UFV160664: P<0.01, control positivo: P<0.05; ANOVA censurado, con prueba de la *t a posteriori*, corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta) (figura 23).
50

Tanto el grupo de 50 µg de UFV160664 con Adjuvlex al 5 % como adyuvante como el grupo de control positivo redujeron significativamente la carga vírica de garganta acumulada (frotis diarios) en comparación con el grupo solo con adyuvante (50 µg de UFV160664: $P < 0.05$, control positivo: $P < 0.001$; ANOVA, con prueba de la *t* a posteriori corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones y pruebas por etapas, comenzando a la dosis más alta) (figura 24).

5 Conclusión

Según la presente invención, se mostró que las dosis tanto de 5 µg como de 50 µg de UFV160664 previnieron la mortalidad. Además, la dosis de 50 µg de UFV160664 redujo la pérdida de peso corporal y redujo significativamente la carga vírica pulmonar y de garganta, de manera similar al grupo de control positivo.

10 Ejemplo 14: Inmunogenicidad humoral y celular después de inmunización de ratones sin exposición previa con vector adenovírico que expresa polipéptido de la invención

En este ejemplo, se evaluó la inmunogenicidad humoral y celular de un intervalo de dosis de un adenovector 26 (Ad26) que contenía ácido nucleico que expresaba un polipéptido de la invención (en particular, polipéptido UFV 171590). Para comparación, se inmunizaron ratones de control con el adenovector vacío, se evaluó una dosis fija de proteína UFV160664 con Adjuvlex al 2 % como adyuvante o un régimen de inmunización heterólogo de sensibilización de UFV171590, refuerzo de UFV160664 con adyuvante.

Los grupos de ratonas BALB/c recibieron dos inmunizaciones intramusculares, con cuatro semanas de diferencia. Tres grupos de ocho ratones se inmunizaron con 10^8 , 10^9 o 10^{10} partículas víricas (pv) de UFV171590. Como control negativo, cuatro ratones recibieron dos inmunizaciones con 10^{10} pv del adenovector vacío (Ad26_vacío). Un grupo de cinco ratones recibió dos inmunizaciones de proteínas con 30 µg de UFV160664 triméricos solubles con Adjuvlex al 2 % como adyuvante. Un grupo de cinco ratones recibieron una inmunización de sensibilización con 10^{10} pv de UFV171590, seguido de una inmunización de refuerzo con 30 µg de UFV160664 con Adjuvlex al 2 % como adyuvante. Tres semanas después de la inmunización de refuerzo, los ratones se sacrificaron y se aislaron muestras de sangre y bazo para analizar la respuesta inmunitaria humoral a H1 A/California/07/09 (ELISA de longitud completa (FL) y ELISA de competición de tallo) y la respuesta inmunitaria a péptidos UFV160664 (ELISpot de linfocitos T), respectivamente.

25 Resultados

Se ha mostrado que todas las dosis del adenovector que contenía ácido nucleico que expresaba el polipéptido de la presente invención inducían títulos de unión de ELISA de HA FL H1 A/California significativos en comparación con inmunización con el vector vacío (10^8 pv, 10^9 pv y 10^{10} pv: $p < 0.001$, modelo de regresión de Tobit basado en la prueba de relación de probabilidad). (Figura 25). Además, se indujeron títulos de anticuerpos específicos de tallo de HA (medidos con un ensayo de competición de CR9114) significativos en 10^9 y 10^{10} pv of UFV171590 en comparación el vector vacío ($p < 0.001$; modelo de regresión de Tobit basado en la prueba de relación de probabilidad) (figura 26). Tanto la sensibilización-refuerzo con UFV160664 con adyuvante así como sensibilización de UFV171590, refuerzo de UFV160664 con adyuvante, indujeron títulos de unión de HA FL H1 A/California/07/09 (figura 25) y títulos de anticuerpos específicos de tallo de HA ($p < 0.001$ modelo de regresión de Tobit basado en la prueba de relación de probabilidad) (figura 26).

Además de una respuesta humoral significativa, UFV171590 indujo una respuesta de linfocitos T de IFN- γ significativa en comparación con el vector vacío según se midió después de la estimulación por péptidos UFV160664 mediante ELISpot de linfocitos T (figura 27). Todas las dosis de UFV171590 indujeron respuestas de linfocitos T significativas ($p < 0.001$; modelo de regresión de Tobit basado en la prueba de relación de probabilidad), así como el grupo de ratones que recibieron sensibilización de UFV171590 seguido de inmunización de refuerzo de UFV160664 ($p < 0.001$). Dos inmunizaciones con UFV160664 con adyuvante no indujeron una respuesta de linfocitos T de IFN- γ detectable (figura 27).

Conclusión

Se ha mostrado que un adenovector 26 que expresa un polipéptido de la invención (UFV171590) induce respuestas humorales y celulares significativas a HA FL H1 A/California/07/09 en un modelo de ratón, en un régimen de inmunización homólogo o en combinación con refuerzo de UFV160664 con adyuvante. UFV160664 con adyuvante también indujo una respuesta inmunitaria humoral significativa pero no indujo una respuesta de linfocitos T detectable en ausencia de una sensibilización con UFV171590.

Ejemplo 15: Transferencia de mutaciones del polipéptido 160664 a diferentes cadenas principales del grupo 1

Expresión de proteínas en células de mamífero

Se sintetizaron fragmentos de ADN que codificaban polipéptidos adicionales de la invención (es decir, basados en diferentes cadenas principales de HA, véase figura 28A) (Genscript) y se clonaron en el plásmido pcDNA2004 (vector pcDNA3 modificado de manera interna con un promotor de CMV mejorado). Los polipéptidos se produjeron en cultivos de células Expi-CHO en medio de expresión ExpiCHOTM mediante transfección transitoria usando el ExpiFectamineTM (Gibco, ThermoFisher Scientific). A los cultivos de células Expi-CHO, se añadieron potenciador ExpiFectamine CHO y alimento ExpiCHO (Gibco, ThermoFisher Scientific) un día después de la transfección. Se recogieron sobrenadantes de cultivo que contenían polipéptidos secretados el día 7 mediante centrifugación seguido de filtración a 0.2 µm.

Análisis de sobrenadante de cultivo

El nivel de polipéptido expresado en el sobrenadante de cultivo recogido se evaluó mediante interferometría de biocapa usando la plataforma OCTET. En resumen, el mAb biotinilado CR9114 se inmovilizó en biosensores de estreptavidina (SA) (Pall FortéBio) después de lo cual, se estableció una curva patrón evaluando el desplazamiento de unión de una serie de diluciones de un polipéptido homólogo purificado bien definido. Posteriormente, se midió el desplazamiento de unión de sobrenadante de cultivo recogido prediluido que contiene el polipéptido (~5-15 µg/ml diluidos en tampón de cinética) y se calculó la concentración usando la curva de calibración establecida.

En segundo lugar, el contenido de polipéptidos de la invención en las recogidas de cultivo de Expi-CHO se evaluó mediante SEC analítico en una configuración de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Infinity serie 1260 (Agilent). El sobrenadante de cultivo que contenía la inyección de proteína de ~3 µg de polipéptido, excepto para UFV180500 (0.8 µg), se procesó (1 ml/min) sobre una columna de gel TSK G3000SWxl (Sigma-Aldrich) y el eluato se supervisó mediante detección UV (DO280, mUA). Los perfiles de SEC se analizaron mediante el paquete de software Astra 6 (Wyatt Technology). El plegamiento del polipéptido se evaluó mediante ensayo homogéneo amplificado (AlphaLISA). El ensayo de equilibrio en solución y en unión se basa en la unión exitosa de una perla tanto donante como aceptora con el polipéptido. Cuando esté en proximidad estrecha, la irradiación por láser de la perla donante a 680 nm genera un flujo de oxígeno singlete, desencadenando acontecimientos químicos en una perla aceptora cercana, lo que da lugar a una emisión quimioluminiscente a 615 nm. Se realizó ensayo AlphaLISA mediante la adición de perlas donantes de níquel (10 µg/ml) y perlasceptoras anti-IgG humano (10 µg/ml, ambas de PerkinElmer) a sobrenadante de cultivo en presencia de CR9114 (2 nM) o MD3606 (2 nM). Los sobrenadantes de cultivo que contienen polipéptidos se valoraron en un intervalo de dilución triple comenzando a 1667 ng/ml. Se realizó lectura después de 2 horas de incubación (temperatura ambiente) usando el lector de placas multimodal EnSight™ (PerkinElmer).

Resultados y conclusión

El análisis de las transfecciones de 35 ml de ExpiCHO muestra que se expresan los polipéptidos marcados con His (figura 28A). Los niveles de expresión variaron de 42 mg/l (cadena principal H5 A/Vietnam/1203/04) hasta 375 mg/l (cadena principal H1 A/California/07/09) e indican que todos los polipéptidos se expresan bien. Asimismo, los perfiles de SEC (figura 28B) muestran que para cada polipéptido expresado es detectable una fracción trimérica (T) y una monomérica (M). Se observaron diferencias en el contenido relativo de trímeros y monómeros dependiendo de la cepa de cadena principal utilizada. Para evaluar el plegamiento correcto del polipéptido, se evaluó la unión de un anticuerpo relevante (CR9114) y multidominio (MD3606) mediante AlphaLISA. Para todos los polipéptidos se observó una señal de unión específica tanto para CR9114 como para MD3606 (figura 28C). La expresión, los perfiles de SEC y datos de unión indican que las mutaciones según la presente invención (p. ej., las mutaciones de UFV160664, que se basa en la cepa A/California/07/09) son transferibles a otras cadenas principales del grupo 1. Por tanto, los polipéptidos UFV180496, UFV180497, UFV190498, UFV180499, UFV180500 y UFV180501, estaban todos plegados correctamente, eran triméricos y se secretaron al sobrenadante de cultivo.

Tabla 12. Aminoácidos convencionales, abreviaturas y propiedades

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de la cadena lateral	Carga de la cadena lateral (pH 7.4)
alanina	Ala	A	no polar	Neutra
arginina	Arg	R	polar	Positiva
asparagina	Asn	N	polar	Neutra
ácido aspártico	Asp	D	polar	Negativa
cisteína	Cys	C	no polar	Neutra
ácido glutámico	Glu	E	polar	Negativa
glutamina	Gln	Q	polar	Neutra
glicina	Gly	G	no polar	Neutra
histidina	His	H	polar	positiva (10 %) neutra (90 %)
isoleucina	Ile	I	no polar	Neutra
leucina	Leu	L	no polar	Neutra
lisina	Lys	K	polar	Positiva
metionina	Met	M	no polar	Neutra

ES 2 926 243 T3

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de la cadena lateral	Carga de la cadena lateral (pH 7.4)
fenilalanina	Phe	F	no polar	Neutra
prolina	Pro	P	no polar	Neutra
serina	Ser	S	polar	Neutra
treonina	Thr	T	polar	Neutra
triptófano	Trp	W	no polar	Neutra
tirosina	Tyr	Y	polar	Neutra
valina	Val	V	no polar	Neutra

BIBLIOGRAFÍA

- Bommakanti *et al.* (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(31): 13701-13706.
- Bommakanti *et al.* (2012), J Virol 86: 13434.
- Ciani *et al.* (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(46):19850-19855.
- 5 Ekiert *et al.* (2009), Science 324:246.
- Ekiert *et al.* (2011), Science 333: 844.
- Das *et al.* (1985), Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 32: 217-236.
- Gill *et al.* (2001), Gene Therapy 8: 1539-1546.
- Kaufmann (2000), Mol Biotechnol 16: 151-160.
- 10 Letarov *et al.* (1993), Biochemistry Moscow 64: 817-823.
- Lorieau *et al.* (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 11341.
- Lu *et al.* (2014), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: 125-130.
- Mallajosyula *et al.* (2014), PNAS, publicado en línea el 9 de junio de 2014: E2514-E2523.
- S-Guthe *et al.* (2004), J. Mol. Biol. 337: 905-915.
- 15 Steel *et al.* (2010), mBio 1(1): 1-9.
- Throsby *et al.* (2008), Plos One 12(3): 1-15.
- Winter *et al.* (1981) Nature 292: 72-75.

SECUENCIAS

- SEQ ID NO 1: H1 de longitud completa (A/Brisbane/59/2007)
- 20 MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
- ENSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP 100
- NPENGTCYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA 150
- SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPN 200
- IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYWTLL 250
- 25 EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRRGFSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG 300
- AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSKLRM VTGLRNIPSI QSRGLFGAIA 350
- GFIEGGWTGM VDGWYGYHHQ NEQSGGYAAD QKSTQNAING ITNKVNSVIE 400
- KMNTQFTAVG KEFNKLERRM ENLNKKVDDG FIDIWTYNAE LLVLENER 450

LDFHDSNVKN LYEKVKSQ LK NNAKEIGNGC FEFYHKCNDE CMESVKNNGTY 500

DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLVSLGAIS 550

FWMCSNGLQ CRICI 565

SEQ ID NO 2: H1 de longitud completa (A/California/07/2009)

5 MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGLKCKLRGVAPLHLGKCNIA GWILGNP
ECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFY
KNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNA DAYVFGSSRYSKFKPEIAIRPKVRDQEG
10 RMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAIN TSLPFQNIHPITIGKCPKYV
KSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMN
TQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDYHDSNVKNLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEY
HKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQILAIYSTVASSL VLVVSLGAISFWMCSNGLQCRICI

SEQ ID NO 3: A/Texas/UR06-0526/2007(H1N1)

15 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCLLKGTAPLQLGNCSVAGWILGN
PECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFY
RNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEEVLVLWGVHHPNIGDQRAIYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRFALSRGFGSGIITSNAPMGECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGEC PKY
VRSALRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK
MNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDYHDSNVKNLYEKVKNQLKNNAKEIGNGC F
20 EYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL VLLISLGAISFWMCSNGLQCR
ICI

SEQ ID NO 4: A/NewYork/629/1995 (H1N1)

25 MKVKLLVLLCAFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGTAPLQLGNCSVAGWILGN
PECESLFSKESWSYIAETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVTASCSHNGKSSF
YKNLLWLTEKNGLYPNLSKSYVNNKEEVLVLWGVHHPNIGDQRAIYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMSECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGEC PKY
VRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKM
NTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDYHDSNVKNLYEKVKNQLKNNAKEIGNGC FE
30 FYHKCNNECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL VLLVSLGAISFWMCSNGLQCR
ICI

SEQ ID NO 5: A/AA_Marton/1943 (H1N1)

35 MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIA GWILGNP
ECESL LSERSWSYIVETPNSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFSKESSWPKHN TTRGVTAACSHAGKSSFY
RNLLWLTEDGSDYVAKGSYNNTSGEQMLIIGVHHPIDETEQR TLYQENAYVSVVSSNYNRRFTPEIAERPKVRGQA
GRMNYWTLKPGD TIMFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMHECDTKCQTPQGAINSSLPFQNIHPVTIGEC PK
YVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK
MNTQFTAVGKEFNLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDYHDSNVKNLYEKVKNQLRNNAKEIGNGC F
40 EYHKCNNECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL VLLVSLGAISFWMCSNGLQCR
ICI

SEQ ID NO 6: A/Adachi/2/57 (H2N2)

40 MAIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVD TILERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCCKLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDR
LLSVPEWSYIMEKENPRNGLCYPGSFN DYEELKHLSSVKHF EKVKILPKDRWTQH TTTGGSQACAVSGNPSFFRN MVW
LTKKGSYDYPVAKGSYNNTSGEQMLIIGVHHPIDETEQR TLYQENAYVSVVSSNYNRRFTPEIAERPKVRGQA
WTL LDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTP LGAIN TTPFHNVHPLTIGEC PKYVKSEK
45 VLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFD GITNKVNSVIEKMNTQFE
AVGKEFGNLERRENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGC FEFYH
KCDDECMNSVKNNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSMGMVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGLQCRICI

SEQ ID NO 7: A/Singapore/1/57 (H2N2)

50 MAIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVD TILERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCCKLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDR
LLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFN DYEELKHLSSVKHF EKVKILPKDRWTQH TTTGGSRACAVSGNPSFFRN MVW
LTEKGSNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIGVHHPNDEKEQRTLYQNVGT YVSVGTSTLNKRSTPDIATR PKV NGLGSRMEF
SWTL LDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTP LGAIN TTPFHNVHPLTIGEC PKYVKSEK
LVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMIDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFD GITNKVNSVIEKMNTQFE
EAVGKEFNSLERRLENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGC FEFYH
HKCDDECMNSVKNNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSMGMVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGLQCRICI

SEQ ID NO 8: A/Viet Nam/1203/2004 H5N1)

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPM
 CDEFINVPWEYSYIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEDIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFFFRNV
 5 VWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYSVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNQSGRMEF
 FWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNR
 LVLATGLRNSPQRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDK
 MNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGC
 FEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSGLQC
 RICI

10 >PROTEÍNA DE VH DE CR9114 (SEQ ID NO: 9)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKSSGGTSNNYAIWVWRQAPGQGLDWMGGISPIFGSTAYAQKFQGRVTISADIFSNTA
 YMELNSLTSEDVAVYFCARHGNYYYYSGMDVWVGQGTTVTVSS

>PROTEÍNA DE VL DE CR9114 (SEQ ID NO: 10)

15 SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVNWWYQQFPGTAPKLLIYSNDQRPSVVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQ
 SEDEAEYYCAAWDDSLKGAVFGGGTQLTVL

>PROTEÍNA DE VH DE CR6261 (SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGAEVKKPGSSVKVCKASGGPFRSYAISWVWRQAPGQGPPEWMGGIPIFG
 TTKYAPKFKGGRVTITADDFAGTVYMELSSLRSEDTAMYYCAKHMGYQVRETMDVWG
 KGTTVTVSS

20 >PROTEÍNA DE VL DE CR6261 (SEQ ID NO: 12)

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNDYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPS
 GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEANYCATWDRRPTAYVVVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO 13: SD15016

25 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGMFFGIAAMGWYRQAPGKQRELVANITSDFSTNYADSVKDRFTISRDNENTVY
 LQMNSLKPEDTAVYYCAADSLGTGWRHYWYWGQGTQVTVSSAAAWSHQPQFEKGAAWSHQPQFEKGAAWSHQPQFEK

SEQ ID NO: 14: SD15004

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSFDRDSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYL
 QMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSAAAWSHQPQFEKGAAWSHQPQFEKGAAWSHQPQFE
 K

30 SEQ ID NO: 15 hemaglutinina CAA24269.1 (virus de gripe A (A/Aichi/2/1968(H3N2)) (excluyendo la secuencia señal)

35 QDLPGNDNST ATLCGLGHHAV PNGTLVKITIT DDQIEVTNAT ELVQSSSTGK 50 ICNNPHRILD GIDCTLIDAL
 LGDPHCDVFQ NETWDLFVER SKAFSNCYPY 100 DVPDYASLRS LVASSGTLEF ITEGFTWTGV TQNGGSNACK
 RGPVSGFFSR 150 LNWLTKSGST YPVLNVTMPN NDNFDKLYIW GIHHPSTNQE QTSLYVQASG 200 RVTVSTRRSQ
 QTIIPNIGSR PWVRLSSRI SIYWTIVKPG DVLVINSNGN 250 LIAPRGYFKM RTGKSSIMRS DAPIIDTCISE
 CITPNGSIPN DKPFQNVNKI 300

TYGACPKYVK QNTLKLATGM RNVPEKQTRG LFGAIAGFIE NGWEGMIDGW 350 YGFRHQNSEG TGQAADLKST
 QAAIDQINGK LNRVIEKTNE KFHQIEKEFS 400 EVEGRIQDLE KYVEDTKIDL WSYNAELLVA LENQHTIDLT
 DSEMKNLFEK 450 TRRQLRENAE EMGNCGFKIY HKCDNACIES IRNGTYDHDV YRDEALNNRF 500 QIKGVELKSG
 YKDWILWISF AISCFLLCVV LLGFIMWACQ RGNIRCNICI 550

40 SEQ ID NO 16: UFV5367

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
 VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
 LLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
 LESMGVYQI

45 SEQ ID NO 17: UFV5369

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
 VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
 LVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAALNREEIDGVK
 ESTRIYQI

SEQ ID NO 135: UFV150553

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEFNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENQRTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMGVYQI

5

SEQ ID NO 30: UFV150558

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLEENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

10

SEQ ID NO 31: UFV150559

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEFNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLEENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

15

SEQ ID NO 32: UFV150565

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMGVYQILAIY

20

SEQ ID NO 33: UFV150566

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMGVYQILA

25

SEQ ID NO 34: UFV150567

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMGVY

30

SEQ ID NO 35: UFV150568

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMG

35

SEQ ID NO 36: UFV150569

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
LES

40

SEQ ID NO 37: UFV150570

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
L

45

SEQ ID NO 38: UFV150571

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLEENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGV

50

SEQ ID NO 39: UFV150572

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKID

SEQ ID NO 40: UFV150573

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK

SEQ ID NO 41: UFV150574

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK

SEQ ID NO 42: UFV150575

15 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQILAIY

SEQ ID NO 43: UFV150576

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQILA

SEQ ID NO 44: UFV150577

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIY

SEQ ID NO 45: UFV150578

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTR

SEQ ID NO 46: UFV150579

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ES

SEQ ID NO 47: UFV150580

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL

SEQ ID NO 48: UFV150581

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGV

SEQ ID NO 49: UFV150582

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEID

SEQ ID NO 50: UFV150583

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREE

SEQ ID NO 51: UFV150584

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNRE

SEQ ID NO 52: UFV150849

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLENQRTLEFHDSDNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMGVYQI

SEQ ID NO 53: UFV150850

15 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 54: UFV150552

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAE
LLVLENQRTLDFHDANVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGVK
LESMGVYQI

SEQ ID NO 55: UFV160088

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQRTAICKEYPKSEQRMECLEKKVDDIEKKIWCYNAE
LLVLENQRTLEFHDINVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGVK
ESMGVYQI

SEQ ID NO 56: UFV160090

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCIEALEKKVDDIEKKIWCYNAEL
LVLLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 57: UFV160093

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGKECNKSERCIEALEKKVDDIEKKIWCYNAEL
LVLLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 58: UFV160097

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 59: UFV160301

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQRRRKKGLFGAIAGFTEGGW
TGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCY
NAELLVLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEID
GVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 60: UFV160302

50 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSRGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL

LVLLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 61: UFV160303

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSRGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 62: UFV160304

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSRGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENQRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO: 63: UFV160360

15 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 64: UFV160361

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKYYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGW
YGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLE
NQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 65: UFV160362

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKYYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG
WYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV
LENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 66: UFV160363

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVD
GWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV
LLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 67: UFV160364

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 68: UFV160365

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRYQI

SEQ ID NO 69: UFV160366

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKYYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTG
MVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNA
ELLVLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGV
KLESTRYQI

SEQ ID NO 70: UFV160367

50 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTG
MVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNA

ELLVLLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 71: UFV160368

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWT
GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYN
AELLVLLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDG
VKLESTRIYQI

SEQ ID NO 72: UFV160369

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLGPKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGW
TGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCY
NAELLVLLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEID
GVKLESTRIYQI

SEQ ID NO: 73: UFV160370

15 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHGPKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 74: UFV160371

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGEGPKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLLLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 75: UFV160372

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWY
YHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENQ
RTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQ
I

SEQ ID NO 76: UFV160373

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWY
GYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLEN
QRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIY
QI

SEQ ID NO 77: UFV160374

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGW
YGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLL
NQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRI
YQI

SEQ ID NO 78: UFV160375

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNVCSSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG
WYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV
LENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES
TRIIYQI

SEQ ID NO 79: UFV160376

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVD
GWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV
LLENQRTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLE
STRIYQI

SEQ ID NO 80: UFV160377

50 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL

VLLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 81: UFV160378

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLVGCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 82: UFV160379

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLVGCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 83: UFV160380

15 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 84: UFV160381

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 85: UFV160382

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSGIKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 86: UFV160383

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSGIVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 87: UFV160384

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGSGIKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 88: UFV160385

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGSGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 89: UFV160386

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDHAGAKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 90: UFV160387

50 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDDEGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL DYHDANVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

LVLLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 91: UFV160388

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDTPVKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 92: UFV160389

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDFPKTKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 93: UFV160390

15 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDEPGDKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 94: UFV160391

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDEPGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 95: UFV160392

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDTGNLKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO: 96: UFV160393

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDTPSSKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 97: UFV160394

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDTPSKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
GWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV
LLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLE
STRIYQI

SEQ ID NO 98: UFV160395

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDATGNKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 99: UFV160396

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDYPGDKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM
VDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL
LVLENQRTLDDYHDANVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKL
ESTRIYQI

SEQ ID NO 100: UFV160397

50 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDYPGDVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMV
DGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV

LLENQRTL DYHDANVK NLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLE STRIYQI

SEQ ID NO 101: UFV160503

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSRKRRGLFGAIAGFTEGGW TGMVDGWYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCY NAELLV LLENQRTL EYHDSNVKNLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEID GVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 102: UFV160504

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPKQRERRRKRGLFGAIAGFTEGG WTGMVDGWYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWC YNAELLV LLENQRTL EYHDSNVKNLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEI DGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 103: UFV160655

15 DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENSKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG WYGYHHQNEQGS GYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV LLENQRTLDFHDANVK NLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCNDECMESVKN GTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLES MGVYQI

SEQ ID NO 104: UFV160656

20 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG WYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV LLENQRTL DYHDANVK NLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES TRIYQI

SEQ ID NO 105: UFV160657

25 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWT GMVDGWYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYN AELLV LLENQRTL DYHDANVK NLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDG VKLESTRIYQI

SEQ ID NO 106: UFV160658

30 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG WYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV LLENQRTL EYHDSNVKNLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES TRIYQI

SEQ ID NO 107: UFV160659

35 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWT GMVDGWYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYN AELLV LLENQRTL EYHDSNVKNLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDG VKLESTRIYQI

SEQ ID NO: 108: UFV160663

40 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGM VDGWYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAEL LV LLENQRTL DYHDANVK NLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLE STRIYQI

SEQ ID NO 109: UFV160664

45 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG WYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV LLENQRTL DYHDSNVKNLYEKVRSQ LKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNT CMESVKN GTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES TRIYQI

SEQ ID NO 110: UFV160665

50 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDG WYGYHHQNEQGS GYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLV L

LENQRRLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES
TRIIYQI

SEQ ID NO 11: UFV160666

5 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWT
GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYN
AELLVLENQRRLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDG
VKLESTRIYQI

SEQ ID NO 112: UFV160667

10 DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWT
GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYN
AELLVLENQRRLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDG
VKLESTRIYQI

SEQ ID NO 138: UFV160655

15 ATGAAAGTCAAACCTGCTGGTCTGCTGTGCACCTTACCGCCACTTACGCCGACACCATCTGTATTGGGTACCACG
CTAACAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTCTGGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAACCTGCTGGA
GAATTCCAAGTACGTCTGCAGCGCCAAGCTGAGGATGGTGACAGGCCTGAGAAATAAGCCCAGCAAGCAGTCCCA
GGGCCTGTTCCGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGAATGGTGGACGGATGGTACGGCTATCA
CCACCAGAACGAGCAGGGCTCCGGCTATGCCGCCGATCAGAAGTCTACCCAGAACGCCATCAATGGCATCACAAA
CAAGGTCAATAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGTCCGAGCAG
20 TGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCTAAGATCTGGTGTCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGC
TGCTCGAGAATCAGAGGACCCTGGACTTCCACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTACGAGAAGGTGAAGTCCCAGCT
GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCAACGACGAGTGTATGGAGTCC
GTGAAGAATGGCACATACGATTATCCTAAGTATTCTGAGGAGAGCAAACCTGAATCGGGAAAAAATCGATGGCGTGAA
ACTGGAATCAATGGGGGTGTATCAGATCTAATAA

25 SEQ ID NO 139: UFV160656

ATGAAGGCCATCCTGGTGGTGTGCTGTACACCTTCGCCACAGCCAACGCCGACACCCCTGTGCATCGGGTACCAC
GCCAACAATTCCACCGACACAGTGGATACAGTGTGAGAGAAGAATGTGACCGTGACACACTCCGTGAACCTGCTGG
AGGATAAGAAGTACGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCAAGCAAGCAGTCCC
30 AGGGCCTGTTCCGAGCCATCGCCGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGAATGGTGGACGGATGGTACGGCTATC
ACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGATACGCCGCCGACCTGAAGTCCACCCAGAATGCCATCGACGAGATTACCA
ACAAGGTCAATAGCGTGATTGAGAAGATGAACACCCAGCCACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGAGCGAGCA
GTGTATGAAGCAGATTGAGGATAAGATTGAGGAGATTGAGTCCAAGATTTGGTGTCTATAACGCCGAGCTGCTGGT
CTGCTCGAGAATCAGAGGACCCTGGACTACCACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGAGGAGCCAG
35 CTGAAGAACAATGCCAAGGAGATTGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCTGTATGGAGT
CTGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATCGGGAGGAAATCGATGGCGT
GAAGCTGGAGAGCACCCGCATCTACCAGATCTAATAA

SEQ ID NO 140: UFV160664

40 ATGAAGGCCATCCTGGTGTGCTGTACACTTTCCGCCACCGCCAACGCTGATACCCTGTGCATCGGGTACCACG
CTAACAACTCTACCGACACAGTGGATACCGTGTGAGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGA
GGATAAGAAGTACGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCAGCAAGCAGAGCCA
GGGCCTGTTTGGAGCAATTGCAGGCTTTACCGAGGGCGGCTGGACAGGCATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCA
CCACCAGAATGAGCAGGGATCTGGATATGCTGCTGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATTGATGAGATCACAAAC
AAGGTCAATAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCGGACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGTCCGAGAGG
45 TGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCTAAGATCTGGTGTCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGC
TGCTCGAGAATCAGCGGACCCTGGACTACCACGACAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGCTCCCAGCT
GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCTGTATGGAGTCT
GTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGGGAGGAAATCGATGGCGTGA
AGCTGGAGTCTACAAGAATCTACCAGATCTAATAA

SEQ ID NO 141: UFV160665

50 ATGAAGGCCATCCTGGTGTGCTGTACACTTTCCGCCACCGCCAACGCTGATACCCTGTGCATCGGGTACCACG
CTAACAACTCTACCGACACAGTGGATACCGTGTGAGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGA
GGATAAGAAGTACGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCAGCAAGCAGAGCCA
GGGCCTGTTTGGAGCAATTGCAGGCTTTACCGAGGGCGGCTGGACAGGCATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCA
CCACCAGAATGAGCAGGGATCTGGATATGCTGCTGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATTGATGAGATCACAAAC
55 AAGGTCAATAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGTCCGAGAGGT
GCATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCTAAGATCTGGTGTCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGC

GCTCGAGAATCAGCGGACCCTGGACTACCACGACAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGCTCCCAGCT
 GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCTGTATGGAGTCT
 GTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGGGAGGAAATCGATGGCGTGA
 AGCTGGAGTCTACAAGAACTACCAGATCTAATAA

5 SEQ ID NO 142: UFV171588 (UFV160655+TM))

ATGAAGGTCAAACCTGCTGGTCTGCTGTGCACCTTTACTGCCACCTACGCTGACACTATCTGTATCGGGTACCACGC
 AAACAACCTCAACCGACACAGTGGATACCGTGCTGGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCCGTGAACCTGCTGGAG
 AATAGCAAGTACGTCTGCAGCGCCAAGCTGCGGATGGTGACAGGCCTGAGAAATAAGCCCTCTAAGCAGAGCCAG
 GGACTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGAATGGTGGACGGATGGTACGGCTATCAC
 10 CACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGCTATGCCGCGGATCAGAAGTCCACCAGAACGCCATCAATGGCATCACAAAC
 AAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTATAATAAGAGCGAGCAGT
 GTATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCTGGTGTACAACGCCGAGCTGCTGGTGC
 TGCTGGAGAATCAGCGCACCCCTGGACTTCCACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGAAGAGCCAGCT
 GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCAACGACGAGTGTATGGAGAGC
 15 GTGAAGAATGGCACCTACGATTATCCTAAGTATTCCGAGGAGTCTAAGCTGAATCGGGAGAAAATCGATGGCGTGA
 AGCTGGAGTCCATGGGCGTGTACCAGATCCTGGCCATCTATTCTACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGTCTGCTGGTGTGAG
 CCTGGGGGCTATTTCACTTCTGGATGTGCTCTAACGGCTCTCTCCAGTGTGCGATTTGTATCTGATAA

SEQ ID NO 143: UFV171589 (UFV160656+TM)

ATGAAGGCCATTCTGGTCGTGCTGCTGTACACTTTCCGCCACCGCTAACGCTGACACCCTGTGCATCGGGTACCACG
 20 CCAATAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTGCTGGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGA
 GGACAAGAAGTACGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCTCTAAGCAGAGCCA
 GGGCCTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGCATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCA
 CCACCAGAACGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATCGACGAGATCACAAA
 CAAGGTCAATTCTGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGAGCGAGCAG
 25 TGATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCTGGTGTATAACGCCGAGCTGCTGGTGC
 TGCTGGAGAATCAGAGGACCCTGGACTACCACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGGTCCCAGCT
 GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCTGTATGGAGTCC
 GTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATTCTGAGGAGGCCAAGCTGAATCGGGAGGAAAATCGATGGCGTGA
 AGCTGGAGTCTACCCGCATCTACCAGATCCTGGCCATCTATAGCACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGTCTGCTGGTGTGTC
 30 CCTGGGGGCTATCTTTCTGGATGTGCTCAAATGGGTCCCTCCAGTGTGCGATCTGTATCTGATAA

SEQ ID NO 144: UFV171590 (UFV160664+TM)

ATGAAGGCCATTCTGGTCGTGCTGCTGTACACTTTCCGCCACCGCTAACGCTGACACCCTGTGCATCGGGTACCACG
 CCAATAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTGCTGGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGA
 35 GGACAAGAAGTACGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCTCTAAGCAGAGCCA
 GGGCCTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGCATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCA
 CCACCAGAACGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATCGACGAGATCACAAA
 CAAGGTCAATTCTGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGAGCGAGAGG
 TGATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCTGGTGTATAACGCCGAGCTGCTGGTGC
 TGCTGGAGAATCAGAGGACCCTGGACTACCACGATAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGGTCCCAGCT
 40 GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCTGTATGGAGTCC
 GTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATTCTGAGGAGGCCAAGCTGAATCGGGAGGAAAATCGATGGCGTGA
 AGCTGGAGTCTACCCGCATCTACCAGATCCTGGCCATCTATAGCACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGTCTGCTGGTGTGTC
 CCTGGGGGCTATCTTTCTGGATGTGCTCAAATGGGTCCCTCCAGTGTGCGATCTGTATCTGATAA

SEQ ID NO 145: UFV171591 (UFV160665+TM)

ATGAAGGCCATTCTGGTCGTGCTGCTGTACACTTTCCGCCACCGCTAACGCTGACACCCTGTGCATCGGGTACCACG
 CCAATAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTGCTGGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGA
 45 GGACAAGAAGTACGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCTCTAAGCAGAGCCA
 GGGCCTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGCATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCA
 CCACCAGAACGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATCGACGAGATCACAAA
 CAAGGTCAATTCTGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGAGCGAGAGG
 50 TGATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCTGGTGTATAACGCCGAGCTGCTGGTGC
 TGCTGGAGAATCAGAGGACCCTGGACTACCACGATAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGGTCCCAGCT
 GAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCTGTATGGAGTCC
 GTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATTCTGAGGAGGCCAAGCTGAATCGGGAGGAAAATCGATGGCGTGA
 55 AGCTGGAGTCTACCCGCATCTACCAGATCCTGGCCATCTATAGCACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGTCTGCTGGTGTGTC
 CCTGGGGGCTATCTTTCTGGATGTGCTCAAATGGGTCCCTCCAGTGTGCGATCTGTATCTGATAA

SEQ ID NO: 146: PROTEÍNA MD3606

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYL
QMNSLKPEDTAVYLVCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSLSC
AASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQQQWR
AAPVAVAAYEFWGGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSE
5 REGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANTVYLVQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQG
TQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYA
DSVKDRFTISRDNANTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
10 KVSNAKALPAIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 147: UFV180496 H1 A/California/07/09

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAI
AGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIE
15 EIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQIHIIIIIIII

SEQ ID NO: 148: UFV180497 H1 A/Michigan/45/2015

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAI
AGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEKCMKQIEDKIE
20 EIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREKIDGVKLESTRIYQIHIIIIIIII

SEQ ID NO: 149: UFV180498 H1 A/Puerto Rico/8/1934

MKANLLVLLCALAAADADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFG
AIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQRTAIGCEYNKSEKCMKQIEDKI
25 EIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEE
ESKLNREKIDGVKLESMGIYQIHIIIIIIII

SEQ ID NO: 150: UFV180499 H5 A/Hong Kong/156/97

MEKTVLLLATVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILERTKYVCSNRLVATGLRNKPKQESQGLFGAIA
GFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKSTQKIDGVTNKVNSIINKMNTQREAIGCEYNKSERCMKQIEDKIE
30 EIESKVWCYNAELLVLMENQRTLDYHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPQYS
EEARLNREEISGVKLESMGTQYQIHIIIIIIII

SEQ ID NO: 151: UFV180500 H5 A/Vietnam/1203/04

MEKIVLLFAIVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTKYVCSNRLVATGLRNKPKQESQGLFGAIA
GFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKSTQKIDGVTNKVNSIINKMNTQREAIGCEYNKSERCMKQIEDKIE
35 EIESKVWCYNAELLVLMENQRTLDYHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYS
EEARLKREEISGVKLESIGIYQIHIIIIIIII

SEQ ID NO: 152: UFV180501 H2 A/Singapore/1/57

MAIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITLERNVTVTHAKDILEKTKYVCSKLVLATGLRNKPKQESQGLFGAIAAGFT
EGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKSTQKIDGVTNKVNSVIEKMNTQREAIGCEYKSERCMKQIEDKIEEIE
40 SKVWCYNAELLVLMENQRTLDYHDSNVKNLYDKVRLQLRDNVRELKNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPKYEEE
SKLNREIKGVKLSMGMVYQIHIIIIIIII

SEQ ID NO: 153: UFV171590 (UFV160664+TM)

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAI
AGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIE
45 EIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de tallo de hemaglutinina (HA) de gripe A de grupo 1, que comprende un dominio HA1 y uno HA2, comprendiendo dicho polipéptido de tallo de HA una secuencia de aminoácidos que comprende:
- (i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1;
- 5 (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2;
- (iii) al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro intramonomérico;
- (iv) al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro intermonomérico;
- en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 434 es Q, y en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se basa en la SEQ ID NO: 15.
- 10 2. Polipéptido según la reivindicación 1, en donde dichos polipéptidos de tallo comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende:
- (i) una supresión de la región de cabeza en el dominio HA1, comprendiendo dicha supresión al menos la secuencia de aminoácidos del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 53 hasta e incluyendo el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 302;
- 15 (ii) una modificación de la región de trimerización en el dominio HA2, preferentemente una modificación de la región de trimerización en la hélice C, comprendiendo dicha región de trimerización la secuencia de aminoácidos del aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 405 hasta e incluyendo el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 419;
- 20 (iii) una cisteína en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 310 y una cisteína en la posición correspondiente a la posición 422;
- (iv) una cisteína en la posición correspondiente a la posición 397 en combinación con una cisteína en la posición correspondiente a la posición 405; o una cisteína en la posición correspondiente a la posición 396 en combinación con una cisteína en la posición correspondiente a la posición 408; o una cisteína en la posición correspondiente a la posición 399 en combinación con una cisteína en la posición 405;
- 25 en donde el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 392 es P, R o Y, preferentemente P o R, y en donde el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 434 es Q.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, en donde la supresión en el dominio HA1 comprende al menos la secuencia de aminoácidos del aminoácido en la posición 47 hasta e incluyendo el aminoácido en la posición 306.
- 30 4. Polipéptido según la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la modificación del dominio de trimerización comprende la introducción de un dominio de trimerización heterólogo en la hélice C.
5. Polipéptido según la reivindicación 4, en donde el dominio de trimerización heterólogo es una secuencia de GCN4.
- 35 6. Polipéptido según la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la modificación del dominio de trimerización comprende una optimización de la secuencia de repetición de héptada en la hélice C.
7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido 392 es Y, P o R y el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 434 es Q y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 442 es A.
- 40 8. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una cisteína en la posición correspondiente a la posición 397 en combinación con una cisteína en la posición correspondiente a la posición 405.
9. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 395 es I;
 - el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 399 es Y o C, preferentemente Y;
 - el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 400 es P;

45 - el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 401 es K;

 - el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 402 es S; y/o

- el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 404 es R o Q.
- 10. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 323 es K y/o el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 326 es K.
- 5 11. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 339 es T.
- 12. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido no comprende un sitio de escisión de proteasa.
- 13. Polipéptido según la reivindicación 12, en donde el aminoácido en la posición 329 no es arginina (R), preferentemente en donde el aminoácido en la posición 329 es glutamina (Q).
- 10 14. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-11, en donde el polipéptido comprende un sitio de escisión natural o un sitio de escisión polibásico.
- 15 15. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende (parte de) una secuencia señal.
- 16. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un dominio HA2 truncado.
- 15 17. Polipéptido según la reivindicación 16, en donde el polipéptido no comprende un dominio transmembrana y citoplasmático.
- 18. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se ha suprimido al menos la parte C-terminal del dominio HA2 que comienza con el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición 516.
- 20 19. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la supresión en el dominio HA1 se ha reemplazado por una secuencia conectora de 1-10 aminoácidos.
- 20. Ácido nucleico que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 21. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de tallo de HA de grupo 1 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-19.
- 22. Vector según la reivindicación 21, en donde el vector es un vector adenovírico recombinante.
- 25 23. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, y/o un ácido nucleico según la reivindicación 20, y/o un vector según la reivindicación 21 o 22, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 24. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, un ácido nucleico según la reivindicación 20, y/o un vector según la reivindicación 21 o 22, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un virus de la gripe.
- 25. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y/o un ácido nucleico según la reivindicación 20, y/o un vector según la reivindicación 21 o 22 para su uso como una vacuna.

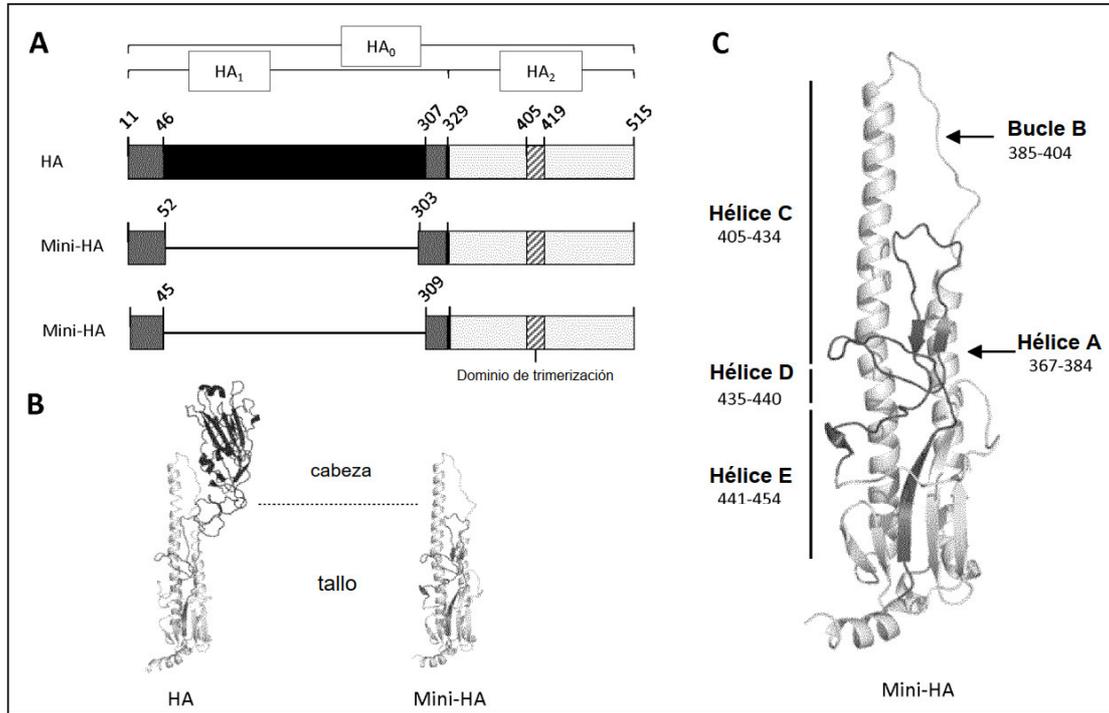


FIG. 1

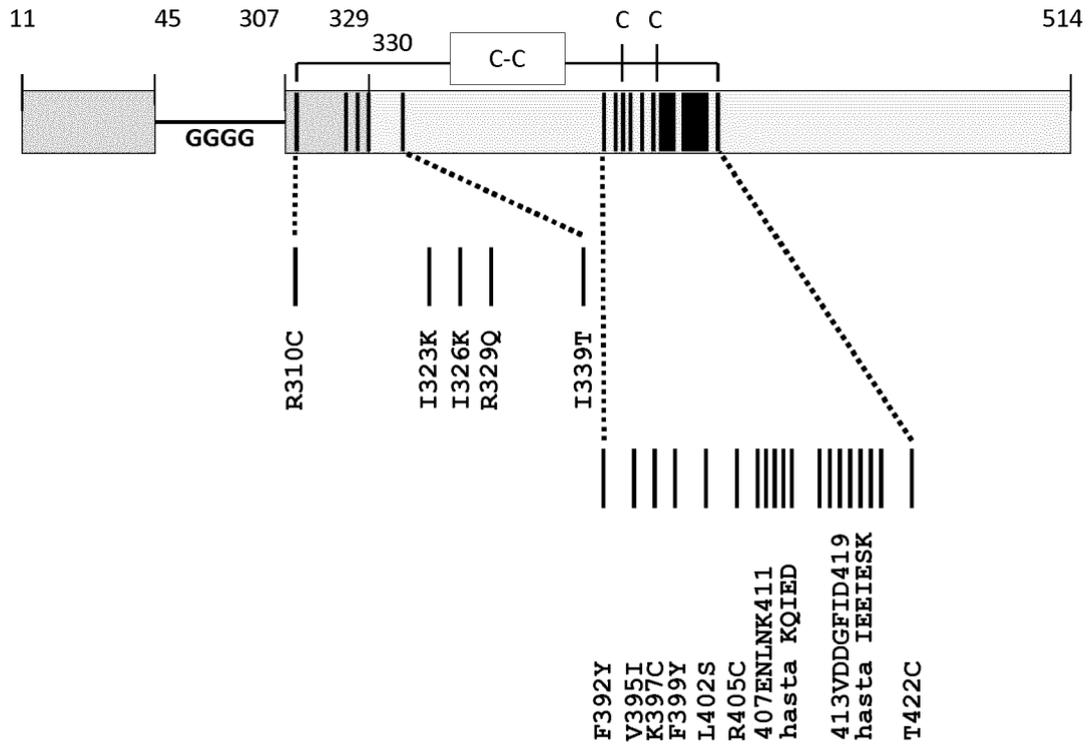


FIG. 2

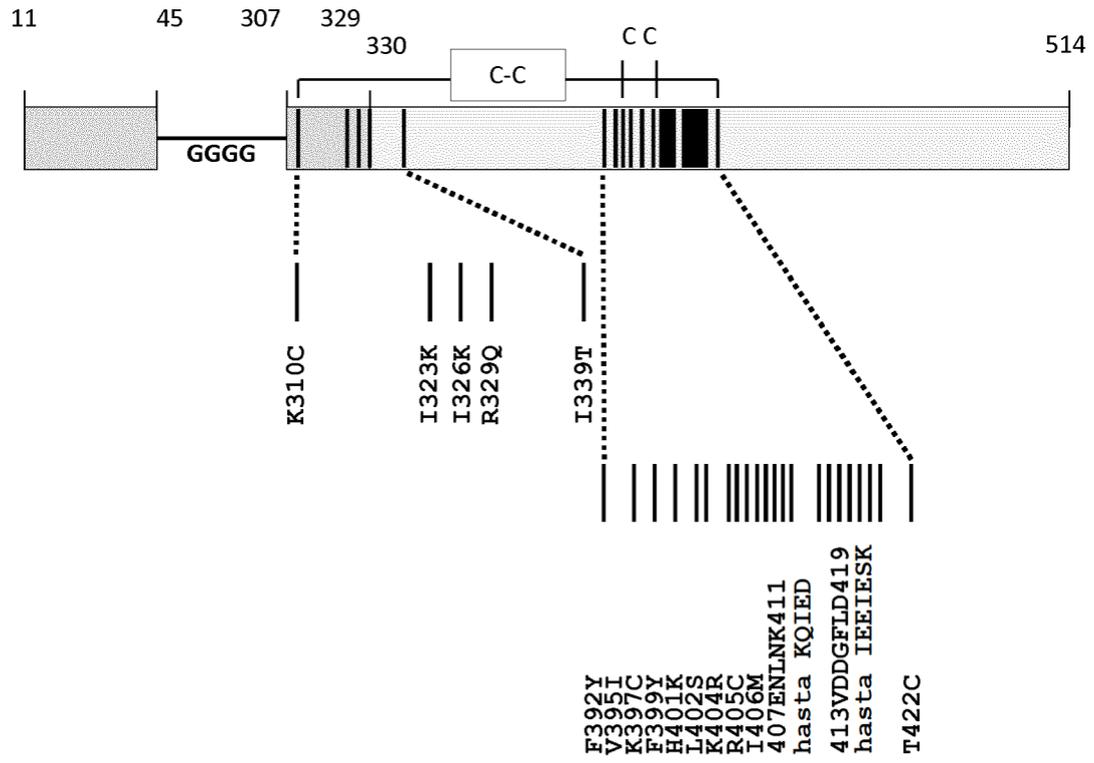


FIG. 3

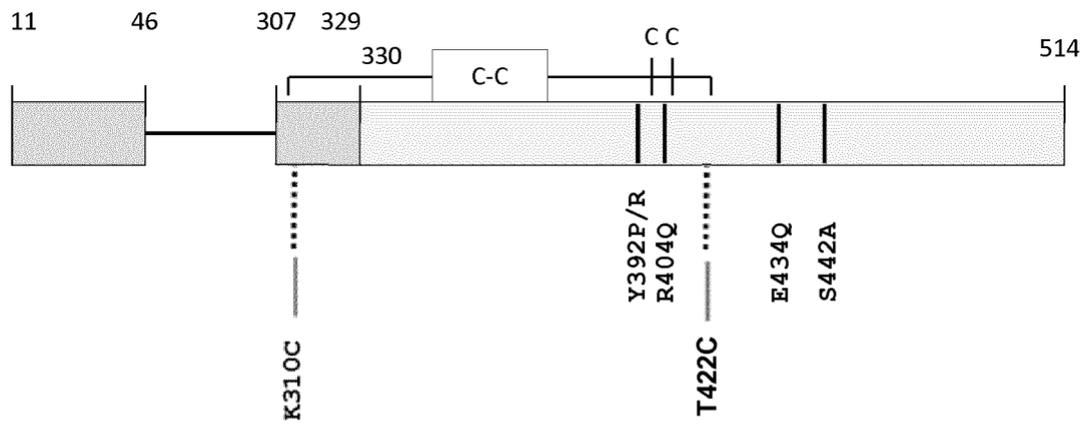


FIG. 4

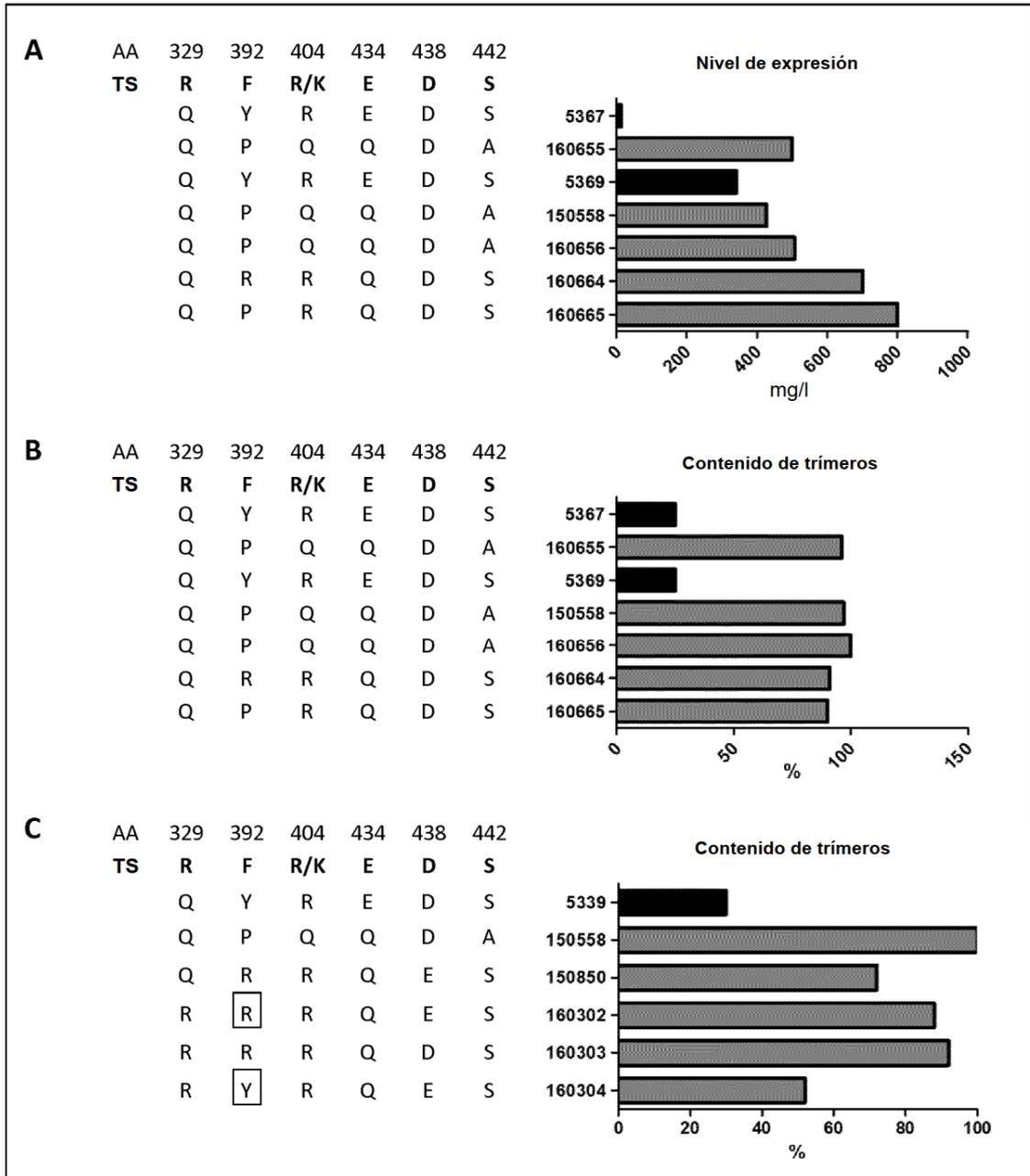


FIG. 5

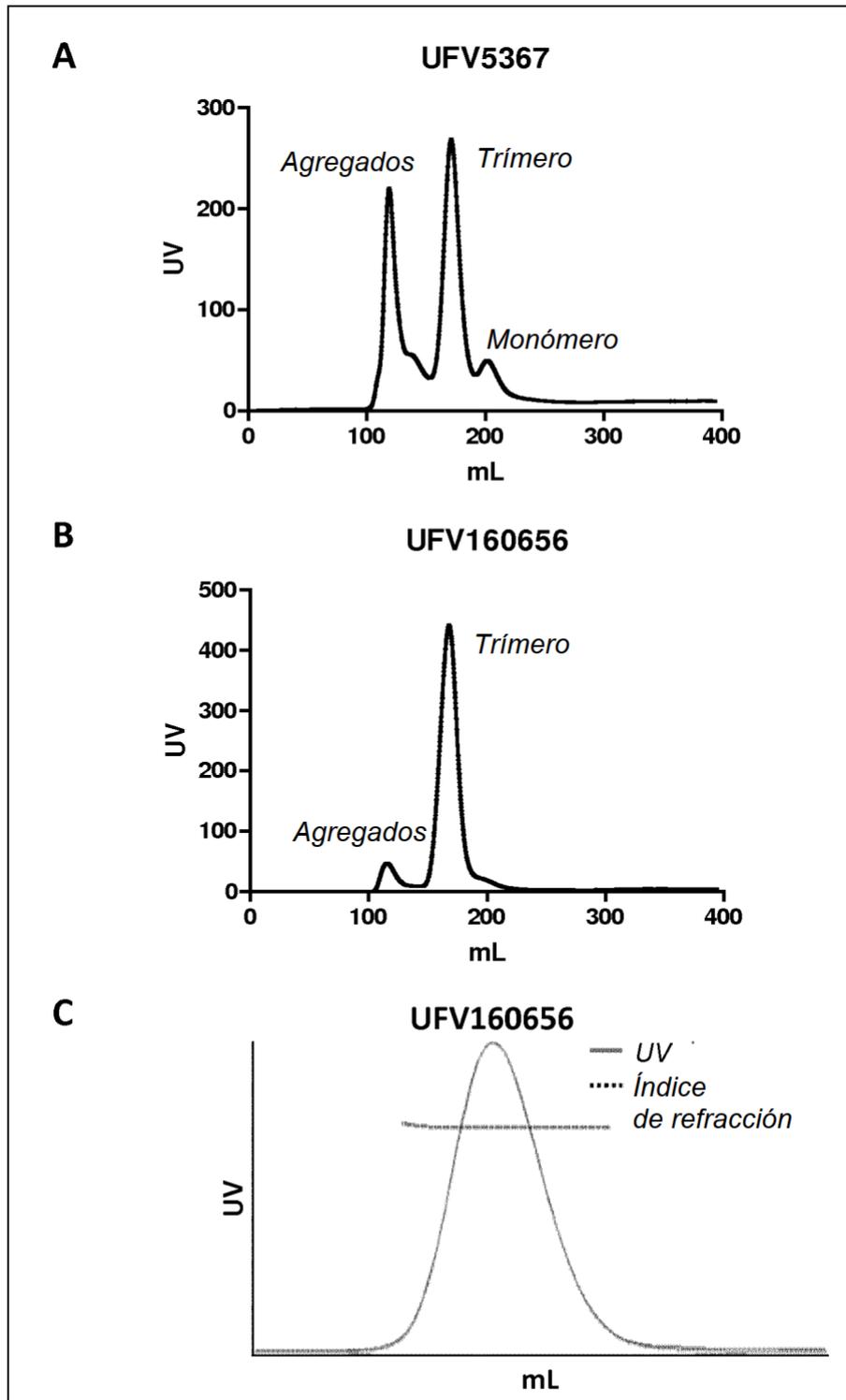
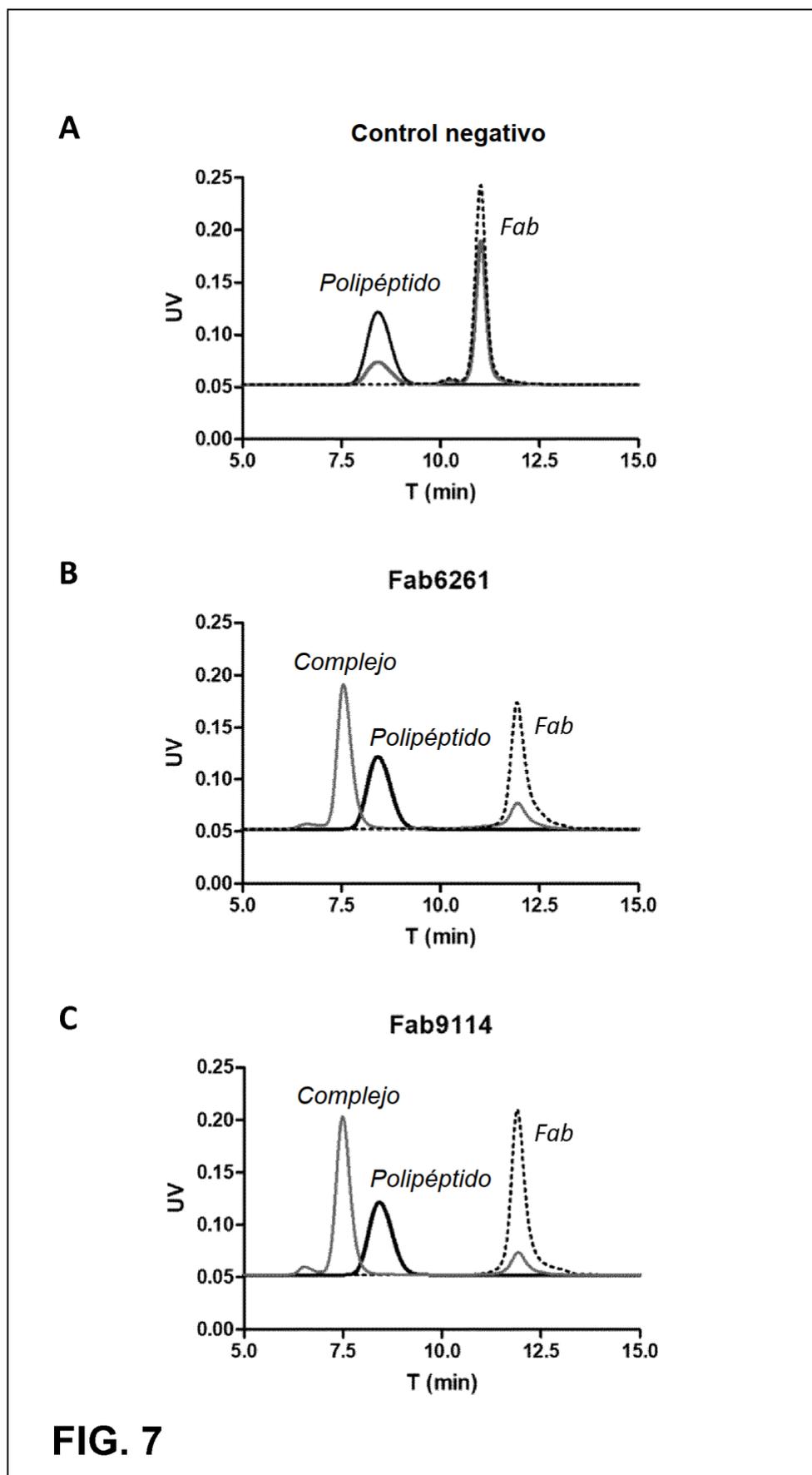


FIG. 6



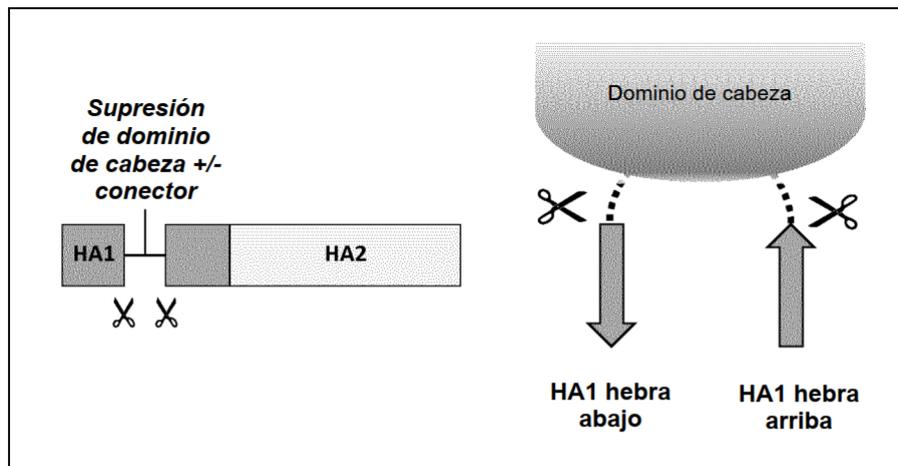


FIG. 8

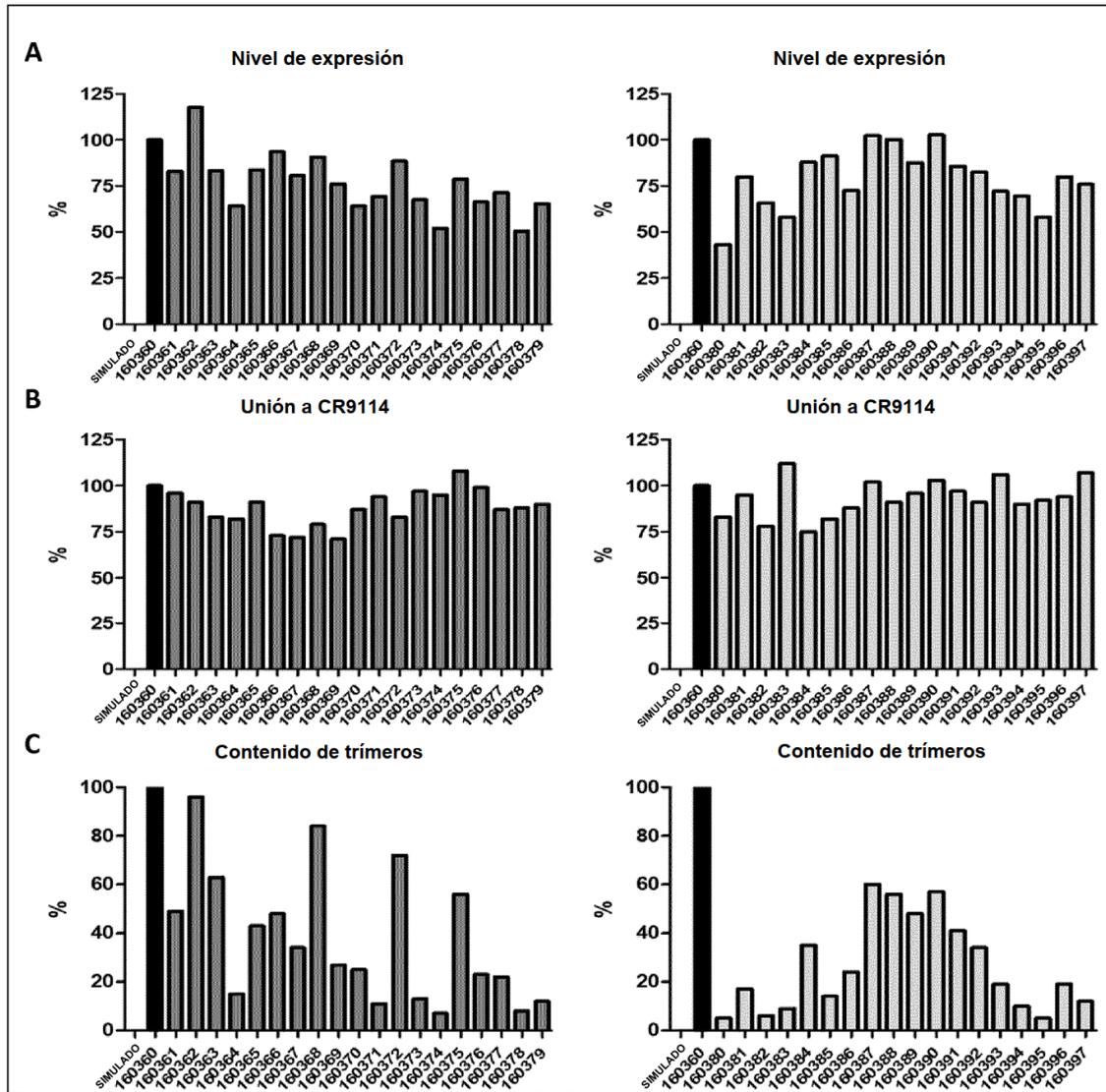


FIG. 9

FIG. 10

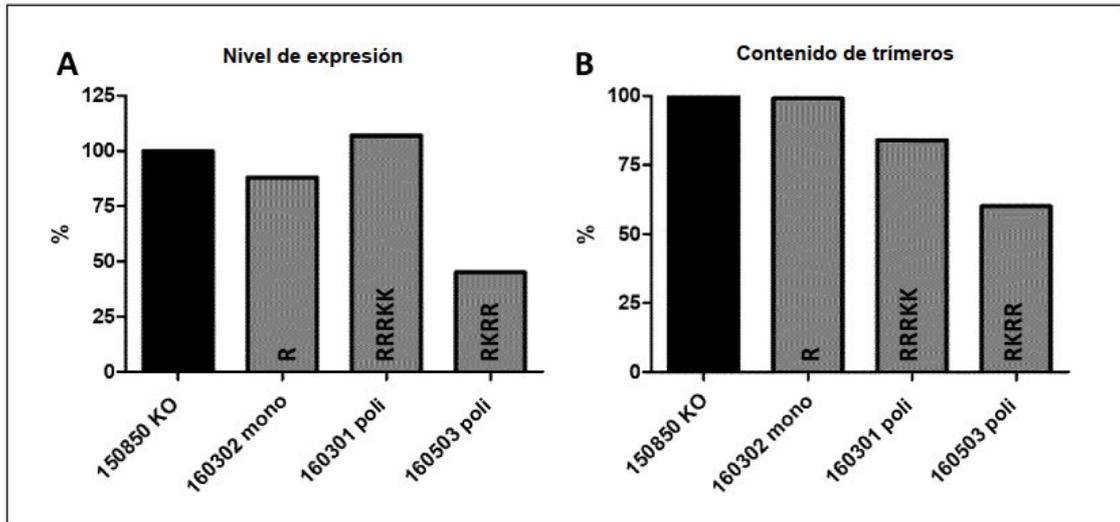
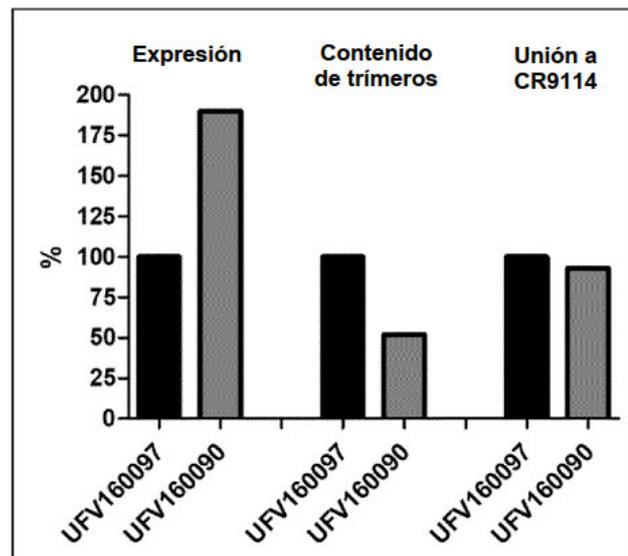


FIG. 11



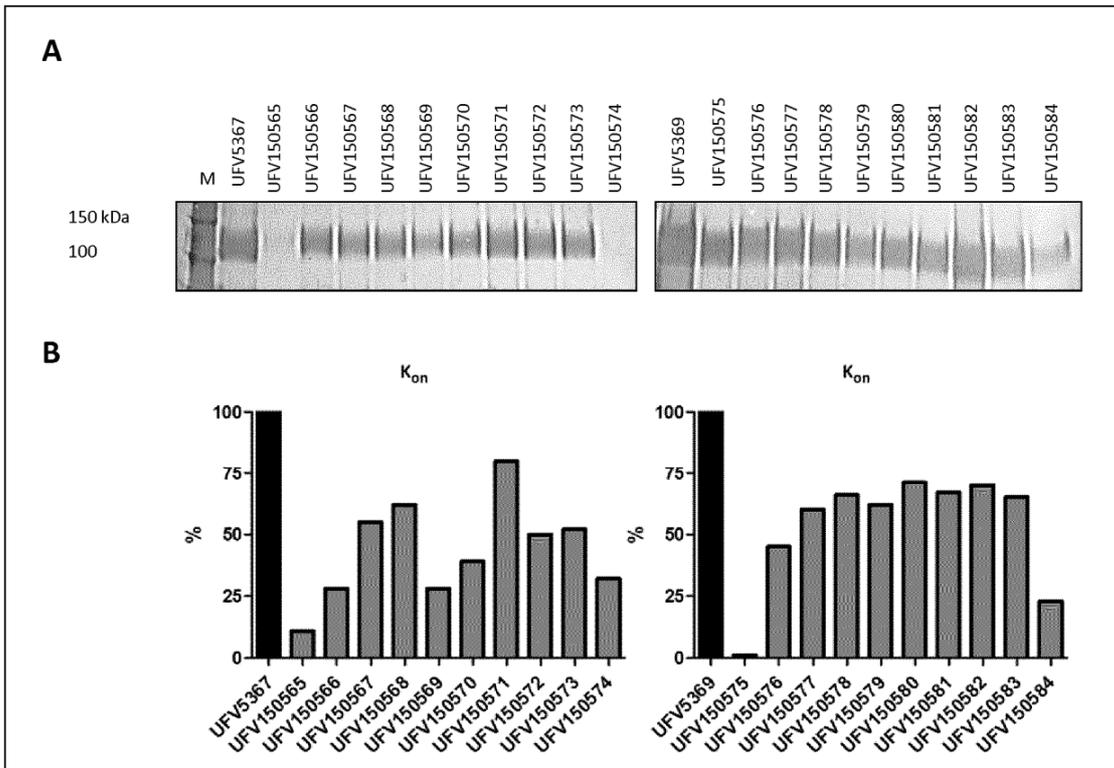


FIG. 12

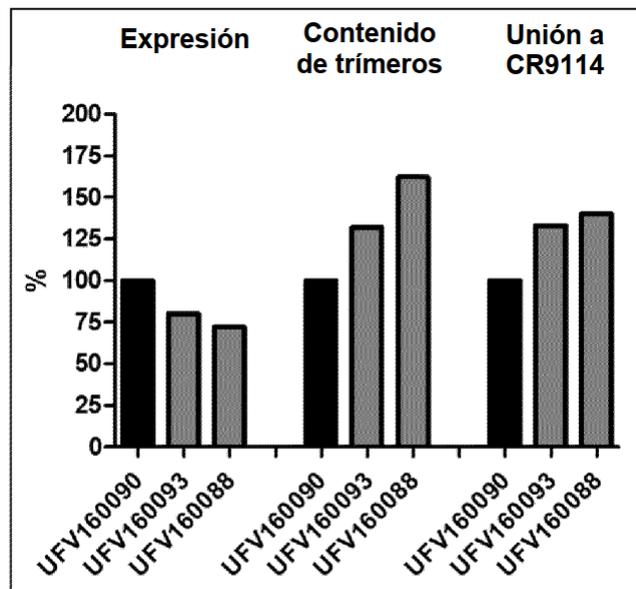


FIG. 13

FIG. 15

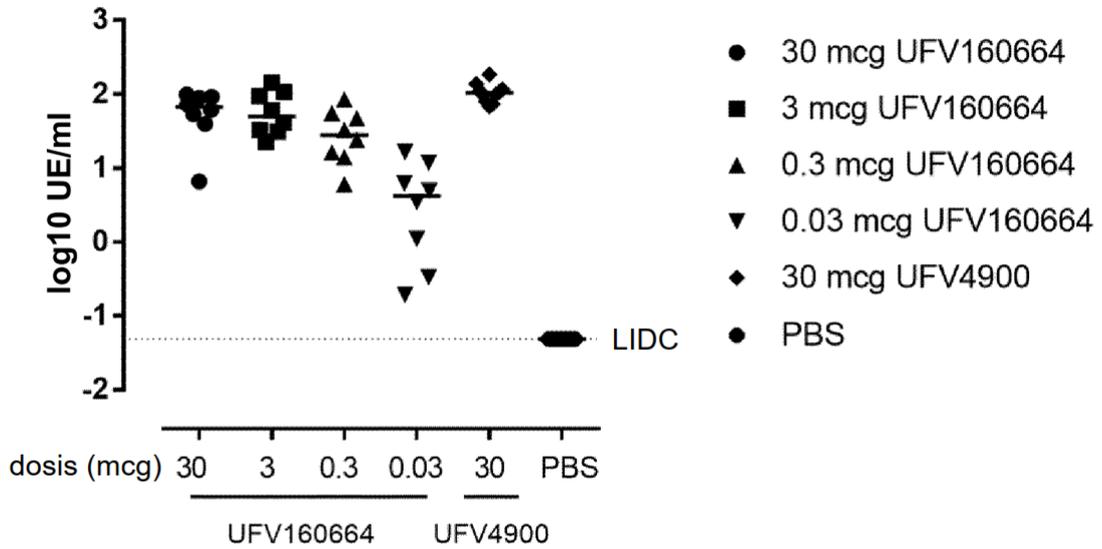


FIG. 16

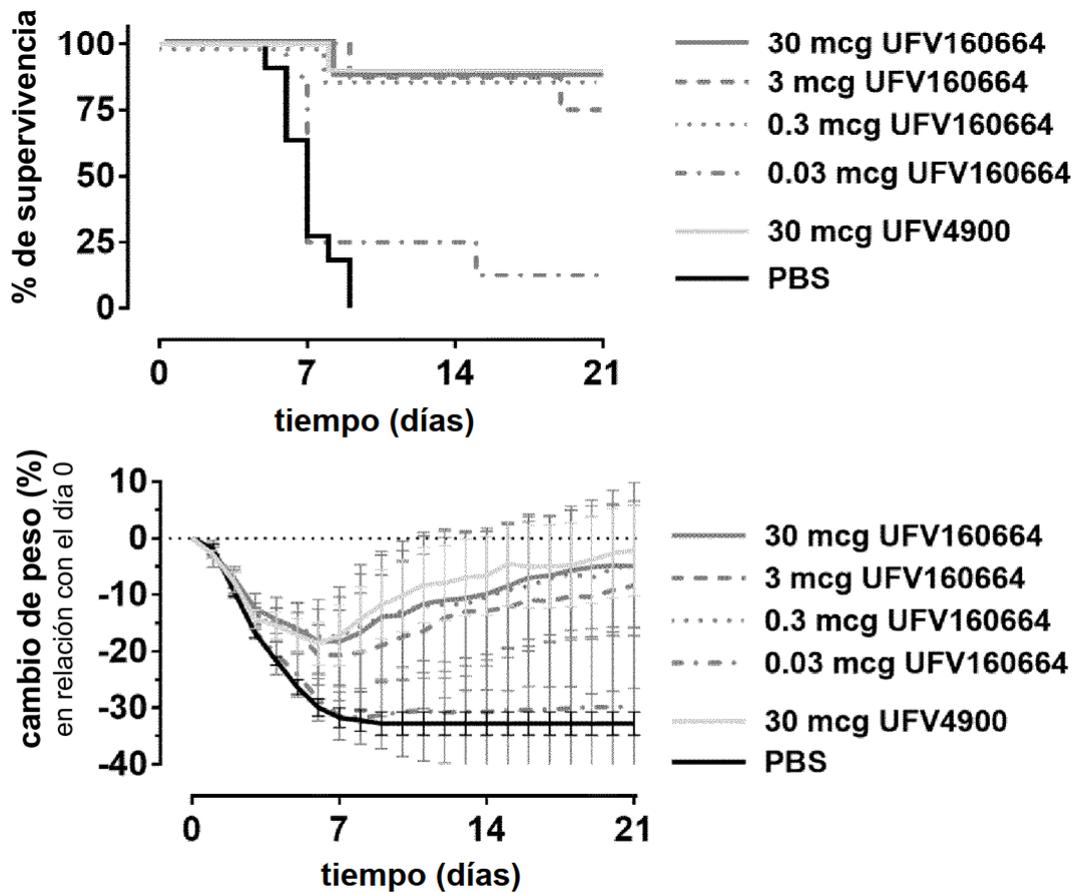


FIG. 17

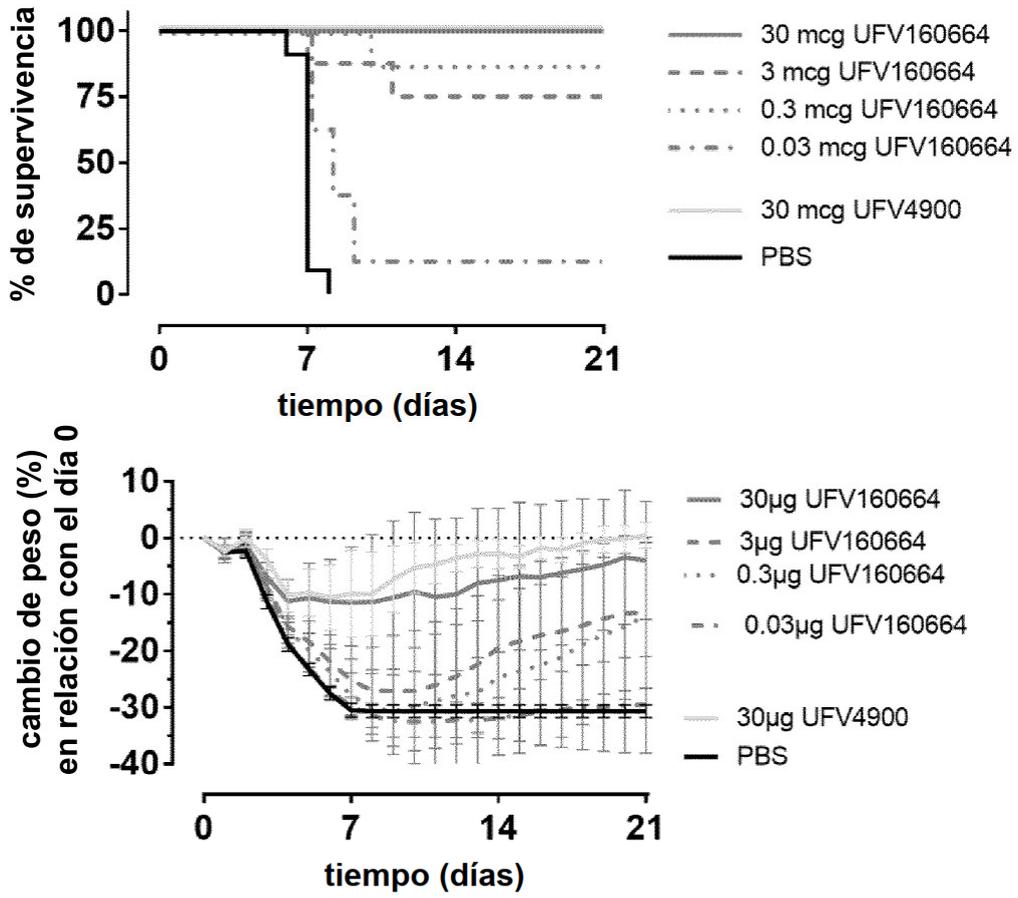


FIG. 18

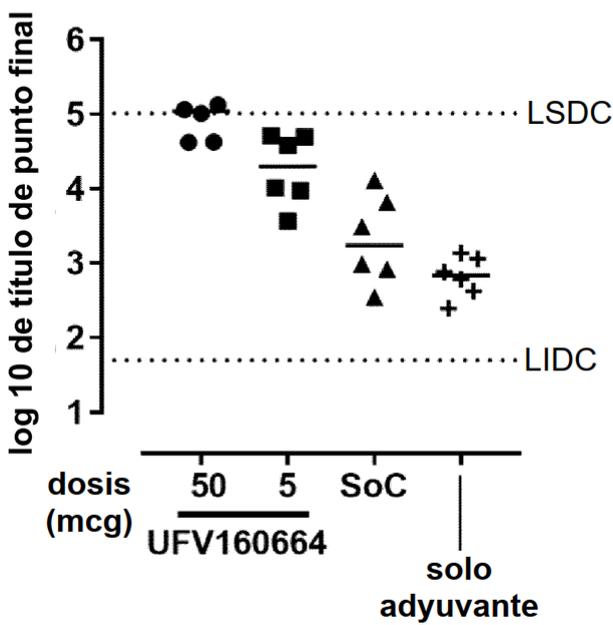


FIG. 19

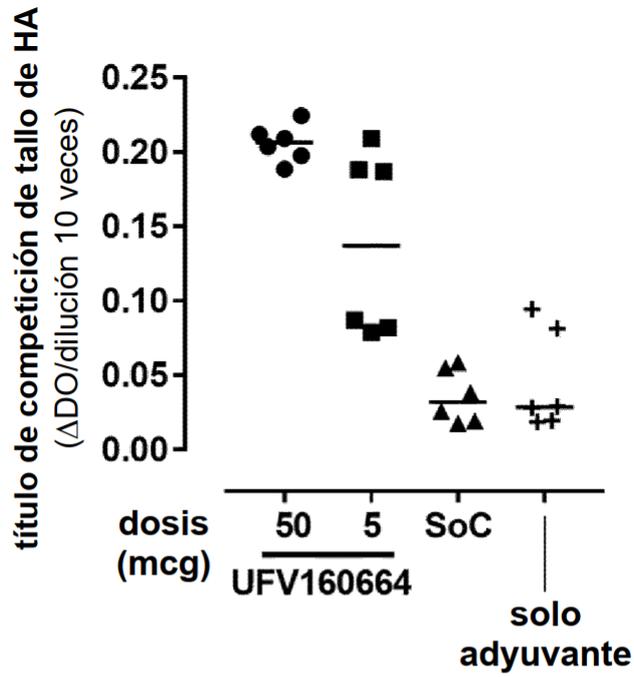
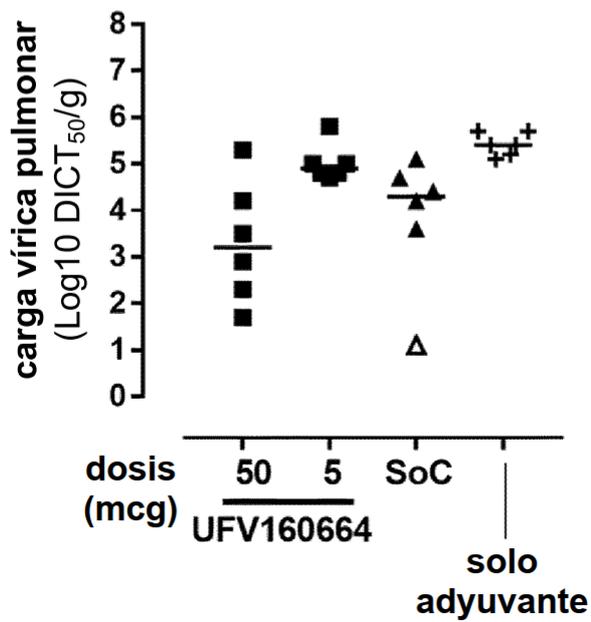


FIG. 20



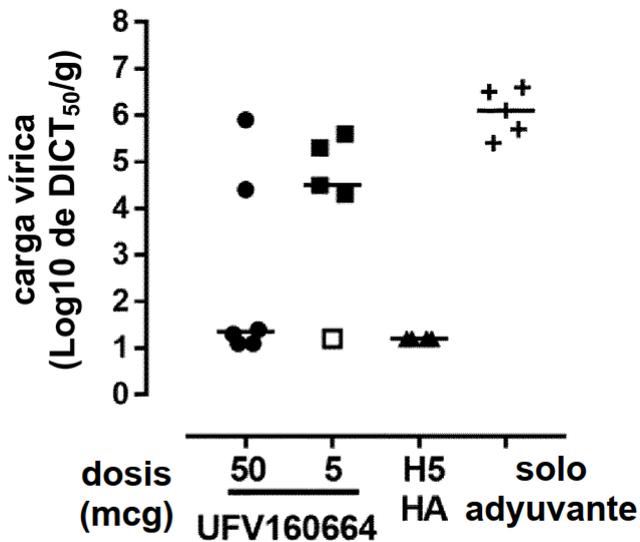
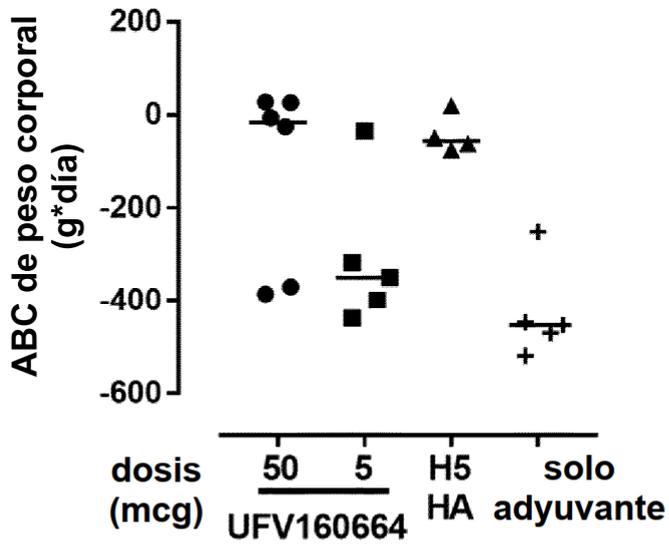
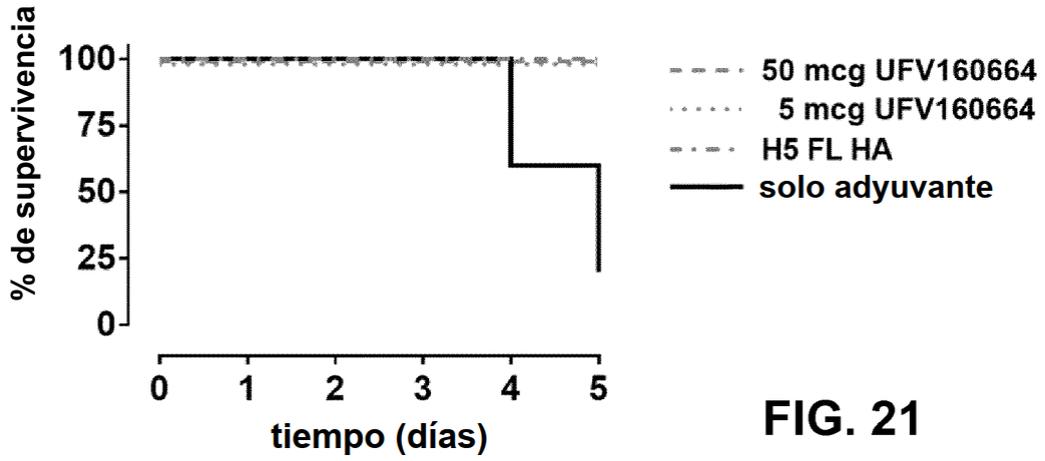


FIG. 24

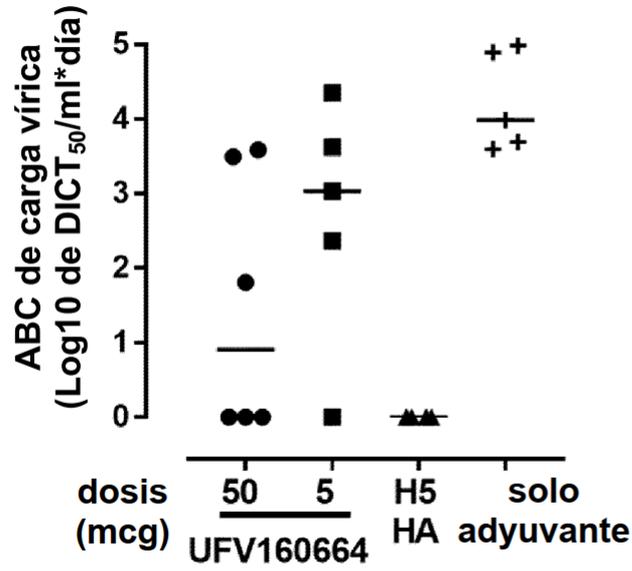


FIG. 25

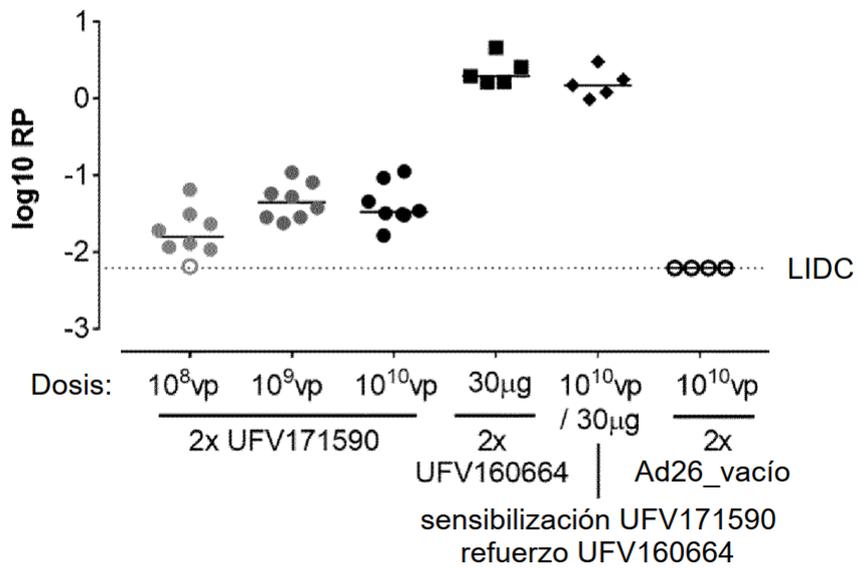


FIG. 26

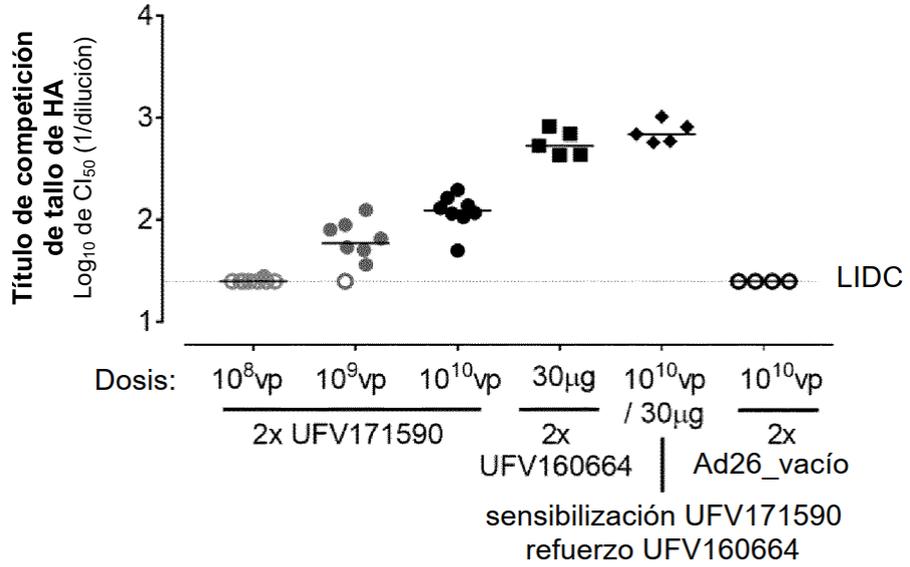


FIG. 27

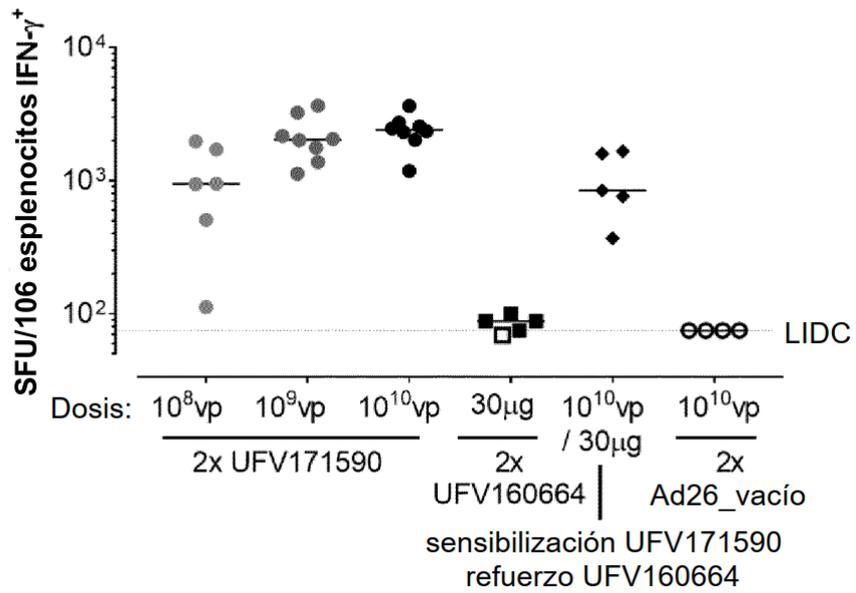
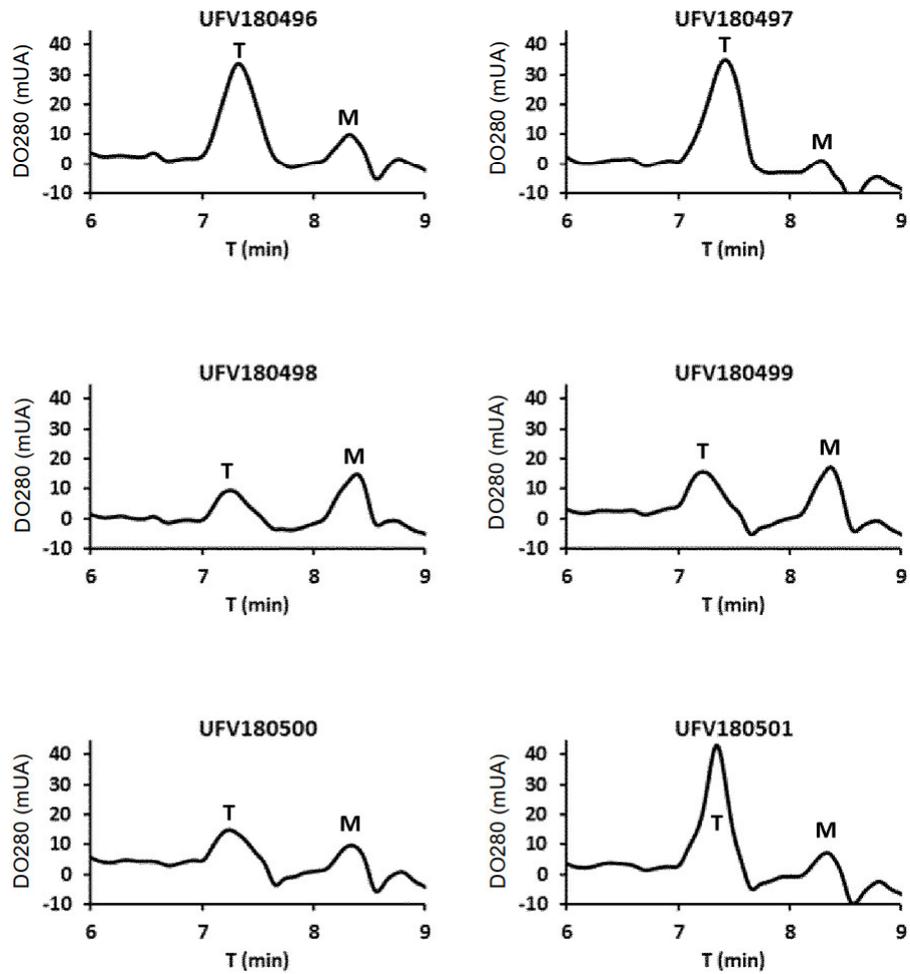


FIG. 28

A

ID.	Cepa	Expresión
UFV180496	H1 A/California/07/09	375 mg/l
UFV180497	H1 A/Michigan/45/2015	367 mg/l
UFV180498	H1 A/Puerto Rico/8/1934	244 mg/l
UFV180499	H5 A/Hong Kong/156/97	133 mg/l
UFV180500	H5 A/Vietnam/1203/04	42 mg/l
UFV180501	H2 A/Singapore/1/57	229 mg/l

B



C

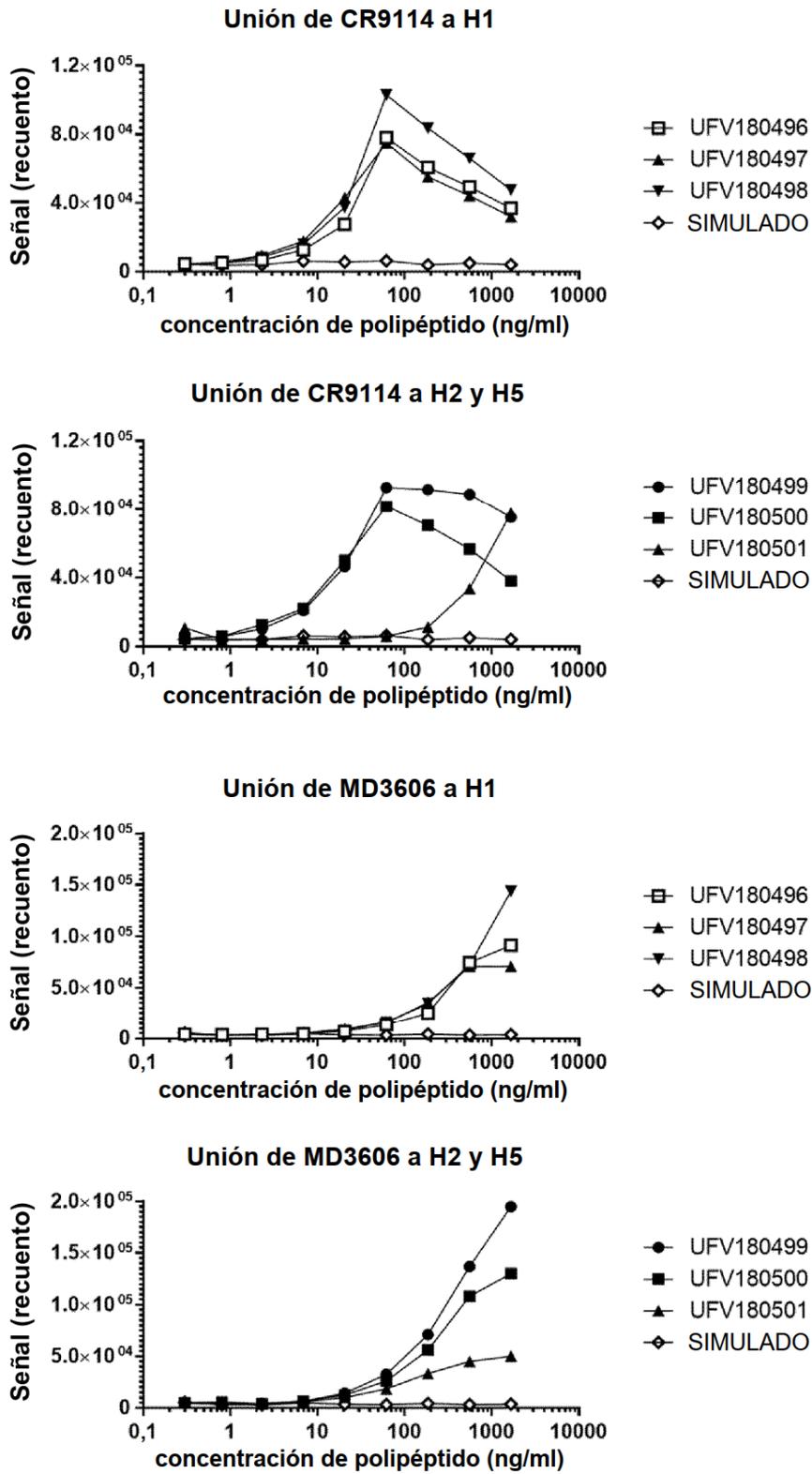


FIG. 28 - continuación