

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201592306 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.05.31

(22) Дата подачи заявки
2014.05.27

(51) Int. Cl. C07K 14/11 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 13169830.0

(32) 2013.05.30

(33) EP

(86) PCT/EP2014/060997

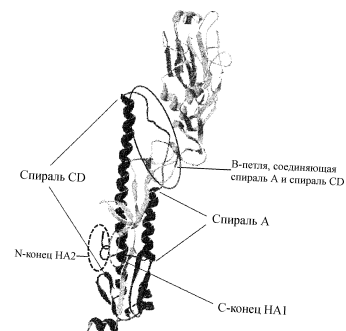
(87) WO 2014/191435 2014.12.04

(71) Заявитель:
КРУСЕЛЛ ХОЛЛАНД Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Мейберг Ян Вилем, Импальяцо
Антоньетта, Радошевич Катарина
(NL), Вадиа Джахангир (US),
Уилльямсон Роберт Энтони (GB),
Вагнер Мишель, Дин Чжаоцин (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, содержащим (а) домен HA1 гемагглютинаина гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, содержащий аминокислоты от положения 1 по положение x, предпочтительно от положения p по положение x домена HA1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1, содержащим аминокислоты от положения y до C-концевой аминокислоты включительно из домена HA1, и (b) домен HA2 гемагглютинаина гриппа, где полипептид стеблевого домена гемагглютинаина гриппа устойчив к расщеплению протеазой на стыке между HA1 и HA2 и где одна или несколько аминокислот из аминокислот в положениях 337, 340, 352, 353, 402, 406, 409, 413 и/или 416 были мутированы по сравнению с соответствующими положениями в HA вируса гриппа дикого типа.



201592306 A1

201592306 A1

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**ВВЕДЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к области медицины. Настоящее изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, способам получения полипептидов стеблевого домена гемагглютинаина, содержащим их композициям, содержащим их вакцинам и способам их применения, в частности, для детекции, профилактики и/или лечения гриппа.

ПРЕДПОСЫЛКИ

Вирусы гриппа являются основными патогенами человека, вызывая респираторное заболевание (обычно называемое "грипп"), которое колеблется по тяжести от субклинической инфекции до первичной вирусной пневмонии, которая может привести к смерти. Клинические эффекты инфекции варьируют в зависимости от вирулентности штамма гриппа и внешнего воздействия, истории болезни, возраста и иммунного статуса хозяина. По оценкам, ежегодно приблизительно 1 млрд человек во всем мире подвергается инфицированию вирусом гриппа, что вызывает тяжелое заболевание в 3-5 миллионах случаев и ориентировочно от 300000 до 500000 смертей, связанных с гриппом. Большую часть этих инфекций можно отнести к вирусам гриппа А, несущим подтипы гемагглютинаина Н1 или Н3, с меньшим вкладом вирусов гриппа В и, следовательно, представителей всех трех включают в сезонную вакцину. Современная практика иммунизации основана на ранней идентификации циркулирующих вирусов гриппа, чтобы обеспечить своевременное получение эффективной сезонной противогриппозной вакцины. Помимо неизбежных трудностей в прогнозировании штаммов, которые будут преобладать во время следующего сезона, в неспособности современных вакцин предупредить заболеваемость и смертность также играют роль противовирусная устойчивость и ускользание от иммунного ответа. В дополнение к этому возможность пандемии, вызванной высоковирулентным вирусным штаммом, происходящим от животных-носителей и рекомбинированным с увеличением распространения от человека к человеку, представляет собой значительную и реальную угрозу для

глобального здравоохранения.

Вирусы гриппа А широко распространены в природе и могут инфицировать множество птиц и млекопитающих. Вирусы гриппа представляют собой оболочечные РНК-вирусы, которые принадлежат к семейству Orthomyxoviridae. Их геномы состоят из восьми одноцепочечных РНК-сегментов, которые кодируют 11 различных белков, один нуклеопротеин (NP), три полимеразных белка (PA, PB1 и PB2), два матричных белка (M1 и M2), три неструктурных белка (NS1, NS2 и PB1-F2) и два внешних гликопротеина: гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). Вирусы классифицируют на основании различий в антигенной структуре белков HA и NA с их различными комбинациями, представляющими уникальные подтипы вируса, которые дополнительно классифицируют на конкретные штаммы вируса гриппа. Хотя все известные подтипы можно обнаружить у птиц, циркулирующими в настоящее время подтипами человеческого гриппа А являются H1N1 и H3N2. Филогенетический анализ продемонстрировал подразделение гемагглютининов на две основные группы: *inter alia* подтипы H1, H2, H5 и H9 в филогенетической группе 1 и *inter alia* подтипы H3, H4 и H7 в филогенетической группе 2.

Штаммы вируса гриппа типа В являются исключительно человеческими. Антигенная изменчивость HA в штаммах вируса гриппа типа В меньше, чем наблюдаемая в штаммах типа А. Две генетически и антигенно различные линии вируса гриппа В, циркулирующие у людей, представлены линиями В/Yamagata/16/88 (также называемая В/Yamagata) и В/Victoria/2/87 (В/Victoria) (Ferguson et al., 2003). Хотя спектр заболеваний, вызываемых вирусами гриппа В, как правило, представлен более легкими формами, чем заболевания, вызываемые вирусами гриппа А, все же часто при инфицировании гриппом В наблюдается тяжелая болезнь, требующая госпитализации.

Известно, что антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, в первую очередь направлены к гемагглютиниону (HA). Гемагглютинин или HA представляет собой трехмерный гликопротеин, который прикреплен к вирусной оболочке и имеет двойную функцию: он отвечает за связывание с сиаловой кислотой рецептора на

клеточной поверхности, а после поглощения он опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембраны, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитозоль клетки. HA содержит крупный головной домен и меньший стеблевой домен. Прикрепление к вирусной мембране опосредуется С-концевой якорной последовательностью, соединенной со стеблевым доменом. Белок посттрансляционно расщепляется в определенной петле с получением двух полипептидов, HA1 и HA2 (полную последовательность называют HA0). Дистальный мембранный головной участок в основном образован из HA1, а проксимальный мембранный стеблевой участок прежде всего из HA2 (ФИГ. 1).

Причиной, по которой сезонная противогриппозная вакцина должна обновляться каждый год, является значительная изменчивость вируса. В молекуле гемагглютинаина эта изменчивость особенно проявляется в головном домене, где антигенный дрейф и сдвиг привели к большому количеству различных вариантов. Поскольку он также представляет собой область, которая является иммунодоминантной, большинство нейтрализующих антител направлены против данного домена и действуют путем препятствования связыванию с рецептором. Сочетанием иммунодоминантности и значительной изменчивости головного домена также объясняется то, что инфицирование определенным штаммом не вызывает иммунитет к другим штаммам: антитела, выработанные в результате первого инфицирования, распознают ограниченное число штаммов, близкородственных вирусу первичной инфекции.

В последнее время полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, не имеющие всего или фактически всего головного глобулярного домена гемагглютинаина вируса гриппа, были описаны и использованы для генерирования иммунного ответа на один или несколько консервативных эпитопов полипептида стеблевого домена. Считается, что эпитопы полипептида стеблевого домена являются менее иммуногенными, чем высокоиммуногенные участки глобулярного головного домена, таким образом, отсутствие глобулярного головного домена в полипептиде стеблевого домена может позволить развить иммунный ответ против одного или нескольких эпитопов полипептида стеблевого домена (Steel et al.,

2010). Steel et al., таким образом, создали новую молекулу путем удаления аминокислотного остатка с 53 по 276 в HA1 штаммов A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) и A/Hong Kong/1968 (H3N2) из первичной последовательности HA, и замещением их короткой гибкой сшивающей последовательностью GGGG. Вакцинация мышей конструкцией H3 HK68 не вызвала выработку антисывороток, которые бы перекрестно реагировали с HA группы 1. Кроме того, как показано в PCT/EP2012/073706, полипептиды стеблевого домена были очень нестабильными и не принимали правильную конформацию, что доказано отсутствием связывания антител, которые, как было показано, связываются с консервативными эпитопами в стеблевом участке.

Кроме того, Vommakanti et al. (2010) описали полипептид на основе HA2, содержащий аминокислотные остатки 1-172 из HA2, 7-аминокислотный линкер (GSAGSAG), аминокислотные остатки 7-46 из HA1, 6-аминокислотный линкер GSAGSA с последующими остатками 290-321 из HA1, с мутациями V297T, I300E, Y302T и C305T в HA1. Конструкция была основана на последовательности HA H3 (A/Hong Kong/1968). Полипептид обеспечивал перекрестную защиту только против другого штамма вируса гриппа в пределах подтипа H3 (A/Phil/2/82), но не против подтипа H1 (A/PR/8/34). В более ранней статье Vommakanti et al. (2012) описана последовательность стеблевого домена на основе HA из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (H1NA0NA6). В этом полипептиде были удалены эквиваленты остатков с 55 по 302 и выполнены мутации I311T, V314T, I316N, C319S, F406D, F409T и L416D. Полипептиды на основе как H3, так и HA, экспрессировали в *E. coli* и, следовательно, в них отсутствовали гликаны, которые являются частью природных белков HA. При экспрессии в *E. coli* полипептид извлекают в основном в виде высокомолекулярных агрегатов и незначительной мономерной фракции. Полипептид связывает CR6261 с двумя выраженными константами диссоциации 9 и 0,2 мкМ. Авторы показали, что мыши могут выжить при контрольном заражении в дозе 1 LD90 гомологичным вирусом H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 после иммунизации (дважды с интервалом 4 недели) с 20 мкг белка, усиленного 100 мкг CpG7909. Авторы также описывают полипептиды с

круговой перестановкой, сравнимые с описанными выше для полипептидов, полученных из A/Hong Kong/1/1968. Эти полипептиды получены из HA из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934, H1N1 A/North Carolina/20/99 или H1N1 A/California/07/2009 и могут обеспечивать частичную защиту на модели умеренного контрольного заражения (1LD90) мышей с H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (т.е. в пределах одного и того же подтипа). Сыворотки крови морских свинок, иммунизированных этими полипептидами, не продемонстрировали обнаруживаемых уровней нейтрализации при испытании в пробе на нейтрализацию.

Таким образом, все еще существует потребность в безопасной и эффективной универсальной вакцине, которая стимулирует выработку надежного ответа нейтрализующих антител широкого спектра и предлагает надежную защиту против широкого набора циркулирующих и будущих штаммов вируса гриппа (как сезонного, так и пандемического), в частности, обеспечивая защиту против одного или нескольких подтипов вируса гриппа А в пределах филогенетической группы 1 и/или группы 2 для эффективной профилактики и терапии гриппа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, способам получения полипептидов стеблевого домена, содержащим их композициям, содержащим их вакцинам и способам их применения.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к новым иммуногенным полипептидам, содержащим стеблевой домен гемагглютинаина вируса гриппа и не имеющим глобулярной головки, названным полипептидами стеблевого домена гемагглютинаина (НА) гриппа. Полипептиды способны индуцировать иммунный ответ при введении пациенту, в частности, пациенту-человеку. Полипептиды по настоящему изобретению представляют консервативные эпитопы проксимального мембранного стеблевого домена молекулы НА иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, которые представлены в дистальном мембранном головном домене. С этой целью часть первичной последовательности белка HA0, составляющую головной домен, удаляют и оставляют аминокислотную

последовательность заново соединяют, либо непосредственно, либо, в некоторых вариантах осуществления, посредством введения короткой гибкой сшивающей последовательности ("линкера") с восстановлением непрерывности аминокислотной цепи. Полученную последовательность дополнительно модифицируют путем введения специфических мутаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы HA0. Иммуногенные полипептиды не содержат полноразмерный HA1 и/или HA2 вируса гриппа.

Согласно настоящему изобретению полипептиды основаны на HA вирусов гриппа А подтипа H1.

Настоящее изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, содержащим (а) домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1, и (b) домен HA2 гемагглютинаина вируса гриппа, где полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина устойчивы к расщеплению протеазой на стыке между HA1 и HA2, и где одна или несколько аминокислот в аминокислотной последовательности, соединяющей A-спираль и спираль CD в HA2, были мутированы по сравнению с доменом HA2 гриппа дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат одну или несколько мутаций в положении 337, 340, 352 или 353 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентных положениях в других вирусах гриппа подтипа H1. Мутация означает, что аминокислота в конкретном положении была заменена другой аминокислотой, которая не представлена в соответствующем положении в HA гриппа дикого типа, т.е. HA вируса гриппа, на котором основан стеблевой полипептид.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению дополнительно содержат одну или несколько мутаций в аминокислотной последовательности HA2, соединяющей C-концевой остаток спирали A с N-концевым остатком спирали CD, как показано на ФИГ. 1.

В некоторых вариантах осуществления N-концевой стеблевой

сегмент HA1 содержит 1-х аминокислоты HA1 и С-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит у-конец аминокислоты (т.е. С-концевую аминокислоту HA1) HA1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления делеция в сегменте HA1 включает аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении x+1 вплоть до аминокислоты в положении у-1. В некоторых вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 содержит, таким образом, аминокислоту р-х HA1, где р представляет собой первую аминокислоту зрелой молекулы HA (например, р=18 в случае SEQ ID NO: 1). Специалист в данной области сможет подготовить полипептиды, описанные в настоящем документе, без сигнальных пептидов (например, аминокислот 1-17 SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению не содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная и трансмембранная последовательность, например, аминокислотная последовательность от положения (или эквивалентного ему) 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 526, 528, 529 или 530 домена HA2 до С-конца домена HA2 была удалена.

Полипептиды по настоящему изобретению не содержат полноразмерный HA1.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды гликозилированы.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные полипептиды являются существенно меньшими, чем HA0, предпочтительно в них отсутствует вся или фактически вся глобулярная головка HA. Предпочтительно, иммуногенные полипептиды составляют не более чем 360, предпочтительно не более чем 350, 340, 330, 320, 310, 305, 300, 295, 290, 285, 280, 275 или 270 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные полипептиды составляют от приблизительно 250 до приблизительно 350,

предпочтительно от приблизительно 260 до приблизительно 340, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды дополнительно содержат одну или несколько дополнительных мутаций в домене HA1 и/или HA2 по сравнению с аминокислотной последовательностью HA, на которой основаны домены HA1 и HA2.

Полипептиды по настоящему изобретению содержат консервативные эпитопы стеблевого домена группы 1 перекрестно-нейтрализующего антитела CR6261 (описанного в WO2008/028946) и/или антитела CR9114 (описанного в WO2013/007770), антитела, способного к связыванию и нейтрализации одновременно вирусов гриппа А группы 1 и группы 2, а также вирусов гриппа В. Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения заключается в обеспечении полипептидов стеблевого домена HA, где указанные полипептиды стабильно представляют эпитопы антитела CR6261 и/или CR9114, как показано посредством связывания указанного антитела или антител с указанными полипептидами. В одном варианте осуществления полипептиды не связываются с CR8020 и CR8057 (описанными в WO 2010/130636), которые являются моноклональными антителами, связывающимися только с вирусами гриппа H3. Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, которые предусмотрены в настоящем документе, приемлемы для применения в иммуногенных композициях (например, вакцинах), способных генерировать иммунные ответы против множества вирусов гриппа штаммов А и/или В. В одном варианте осуществления полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа способны генерировать иммунные ответы против штаммов вируса гриппа А филогенетической группы 1 и/или группы 2, в частности, против штаммов вируса гриппа как филогенетической группы 1, так и группы 2. В одном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ против гомологичных штаммов вируса гриппа. В одном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ против гетерологичных штаммов вируса гриппа одного и того же и/или разных подтипов. В дополнительном

варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ в отношении штаммов вируса гриппа как филогенетической группы 1, так и группы 2, и штаммов вируса гриппа В.

Полипептиды согласно настоящему изобретению можно использовать, например, в самостоятельной терапии и/или профилактике и/или диагностике заболевания или состояния, вызванного вирусом гриппа, в частности, вирусом гриппа А филогенетической группы 1 или 2 и/или вирусом гриппа В, или в сочетании с другими профилактическими и/или терапевтическими методами лечения, такими как (существующие или будущие) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуногенные полипептиды.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунного ответа у пациента, включающим введение пациенту полипептида и/или молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим полипептид и/или молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Иммуногенные композиции по изобретению могут находиться в любой форме, которая позволяет вводить композиции пациенту, например, мышам, хорькам или людям. В конкретном варианте осуществления иммуногенные композиции приемлемы для введения человеку. Полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот и композиции можно использовать в способах профилактики и/или лечения заболевания, вызванного вирусом гриппа и/или для диагностических целей. Композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат или вводятся в комбинации с адъювантом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к

полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для применения в качестве вакцины. Настоящее изобретение, в частности, относится к иммуногенным полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для применения в качестве вакцины для профилактики и/или лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом гриппа подтипа А филогенетической группы 1 и/или 2 и/или вирусом гриппа В.

Различные варианты осуществления и применения полипептидов согласно настоящему изобретению станут очевидными из нижеследующего подробного описания настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Показана модель мономера НА в состоянии перед слиянием, как представлено в нативном тримере. НА1 показан светло-серым, НА2 показан темно-серым. Спираль А (важная часть эпитопа CR6261) и спираль CD (часть поверхности тримера) указаны, как и петля, соединяющая эти элементы вторичной структуры. С-конец НА1 и N-конец НА2 также указаны. Гибридный пептид расположен на N-конце НА2.

ФИГ. 2. Связывание растворимых полипептидов по настоящему изобретению с моноклональными антителами CR6261 и CR9114 с использованием интерферометрии биослоя. Верхние панели показывают индивидуальные кривые связывания для иммобилизованных моноклональных антител под воздействием различных концентраций растворимых полипептидов по настоящему изобретению, нижние панели показывают анализ в равновесном состоянии, используемый для оценки K_d . **A:** s127H1 SEQ ID NO: 66. **B:** s86B4 SEQ ID NO: 67. **C:** s74H9 SEQ ID NO: 65. **D:** s6E12 SEQ ID NO: 69. **E:** s55G7 SEQ ID NO: 68.

ФИГ. 3. Эксклюзионные хроматограммы растворимых полипептидов по настоящему изобретению при отсутствии и в присутствии Fab-фрагментов CR8020, CR6261 и CR9114. Для всех растворимых полипептидов по настоящему изобретению наблюдали образование комплекса с Fab-фрагментами CR6261 и CR9114, но не с Fab-фрагментами CR8020. **A:** s127H1 SEQ ID NO: 66. **B:** s86B4 SEQ ID NO: 67. **C:** s74H9 SEQ ID NO: 65. **D:** s6E12 SEQ ID NO: 69. **E:** s55G7 SEQ ID NO: 68.

ФИГ. 4. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению s74N9 SEQ ID NO: 65 и s86B4 SEQ ID NO: 67 на модели летального контрольного заражения гриппом H1N1 A/NL/602/09. **А:** Верхний ряд: Выживаемость, среднее изменение массы тела и среднее значение клинического показателя для групп отрицательного (PBS) и положительного (CR6261) контроля. Нижний ряд: Выживаемость, среднее изменение массы тела и среднее значение клинического показателя для экспериментальных групп, иммунизированных s74N9 или s86B4. Для сравнения также показана группа отрицательного контроля PBS. **В:** Иммуногенность s74N9 (SEQ ID NO: 65) и s86B4 (SEQ ID NO: 67). Верхний ряд: левая и средняя панель: иммунизация индуцирует антитела, способные к распознаванию когнатного антигена (s74N9 - левая, s86B4 - средняя панель), а также полноразмерного HA из H1N1 A/Brisbane/59/07 (правая панель), как определено с помощью ELISA. Нижний ряд: Индуцированные антитела способны конкурировать с CR9114 за связывание с полноразмерным HA из H1N1 A/Brisbane/59/07 в конкурентном ELISA (левая панель). Для сравнения уровни конкуренции с немеченым CR9114 (т.е. самоконкуренция) и несвязывающим моноклональным антителом CR8020, оба в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл, показаны на отдельном графике.

ФИГ. 5. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению s127H1 (SEQ ID NO: 66) на модели летального контрольного заражения гриппом H1N1 A/Puerto Rico/8/1934. **А:** Верхний ряд: Выживаемость, среднее изменение массы тела и среднее значение клинического показателя для групп отрицательного (PBS) и положительного (CR6261) контроля. Нижний ряд: Выживаемость, среднее изменение массы тела и среднее значение клинического показателя для экспериментальной группы, иммунизированной s127H1 (SEQ ID NO: 35). Для сравнения также показана группа отрицательного контроля PBS.

В: Иммуногенность s127H1 (SEQ ID NO: 35). Верхний ряд: иммунизация индуцирует антитела, способные к распознаванию когнатного антигена s127H1 (SEQ ID NO: 35) (левая панель), а также полноразмерного HA из H1N1 A/Brisbane/59/07 (правая

панель), как определено с помощью ELISA. Нижний ряд: Индуцированные антитела способны конкурировать с CR9114 за связывание с полноразмерным HA из H1N1 A/Brisbane/59/07 в конкурентном ELISA (левая панель). Для сравнения уровни конкуренции с немеченым CR9114 (т.е. самоконкуренция) и несвязывающим моноклональным антителом CR8020, оба в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл, показаны на отдельном графике.

ФИГ. 6. Наблюдаемая и ожидаемая частота встречаемости аминокислоты в указанном положении в последовательностях набора 1, которые показывают улучшенное связывание с CR6261. Значения выражены в процентах от общего числа последовательностей набора 1, которые показывают улучшенное связывание CR6261. Ожидаемые значения рассчитаны как 100%, деленные на число переменных аминокислот в каждом положении, включенном в набор.

ФИГ. 7. Частота встречаемости комбинаций аминокислот в улучшенных связывающих веществах для CR6261 из набора 1. Последовательности с улучшенным связыванием с CR6261 сгруппировали согласно присутствию аминокислот в положениях, указанных слева, и частоту каждой комбинации рассчитали как процент от общего числа последовательностей набора 1, которые показали улучшенное связывание CR6261. Комбинации, которые более распространены, обведены рамкой. А. Анализ комбинационных последовательностей в области гибридного пептида. В. Анализ области В-петли.

ФИГ. 8. Наблюдаемая и ожидаемая частота встречаемости аминокислоты в указанном положении в последовательностях набора 2, которые показывают улучшенное связывание с CR6261. Значения выражены в процентах от общего числа последовательностей набора 2, которые показывают улучшенное связывание CR6261. Ожидаемые значения рассчитаны как 100%, деленные на число переменных аминокислот в каждом положении, включенном в набор.

ФИГ. 9. Частота встречаемости комбинаций аминокислот в улучшенных связывающих веществах для CR6261 из набора 2. Последовательности с улучшенным связыванием с CR6261 сгруппировали согласно присутствию аминокислот в положениях,

указанных слева, и частоту каждой комбинации рассчитали как процент от общего числа последовательностей набора 2, которые показали улучшенное связывание CR6261. Комбинации, которые более распространены, обведены рамкой. Изменение в положении 402 не было включено в анализ, так как все улучшенные связывающие последовательности содержат Met в этом положении, в то время как для положения 352 учли только последовательности, содержащие либо Phe, либо Tyr. А. Анализ комбинационных последовательностей в области гибридного пептида. В. Анализ области В-петли.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Определения терминов, применяемых в настоящем изобретении, даны ниже.

Аминокислота согласно настоящему изобретению может быть любой из двадцати природных (или 'стандартных' аминокислот) или их вариантами, такими как, например, D-пролин (D-энантиомер пролина), или любыми вариантами, которые не обнаружены в природе в белках, такими как, например, норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают особыми свойствами, например, цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими остатками цистеина, пролин, который образует цикл с полипептидным каркасом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В Таблице 2 представлены аббревиатуры и свойства стандартных аминокислот.

Выражение "идентичность аминокислотной последовательности" относится к степени идентичности или сходства между парой выравненных аминокислотных последовательностей, как правило, выраженной в процентах. Процент идентичности представляет собой процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными (т.е. аминокислотные остатки в данном положении в выравнивании представляют собой такой же остаток) или сходными (т.е.

аминокислотная замена в данном положении в выравнивании представляет собой консервативную замену, как описано ниже) с соответствующим аминокислотным остатком в пептиде после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента гомологии последовательности. Гомологию последовательности, в том числе процентные доли идентичности и сходства последовательностей, определяют с использованием методов выравнивания последовательностей, хорошо известных в данной области техники, например, путем визуального осмотра и математических расчетов, или более предпочтительно, сравнение осуществляют путем сравнения информации о последовательности с использованием компьютерной программы. В качестве примера, предпочтительной компьютерной программой является разработанная Genetics Computer Group (GCG; Мэдисон, Висконсин) программа 'GAP' версии 10.0 пакета Wisconsin (Devereux et al. (1984)).

"Консервативная замена" относится к замене аминокислоты одного класса другой аминокислотой того же класса. В конкретных вариантах осуществления консервативная замена не изменяет структуру или функцию, или и то, и другое, полипептида. Классы аминокислот для консервативной замены включают гидрофобные (например, Met, Ala, Val, Leu), нейтральные гидрофильные (например, Cys, Ser, Thr), кислые (например, Asp, Glu), основные (например, Asn, Gln, His, Lys, Arg), разрушители конформации (например, Gly, Pro) и ароматические (например, Trp, Tyr, Phe).

Применяемые в настоящем документе термины "заболевание" и "нарушение" используют взаимозаменяемо по отношению к состоянию пациента. В некоторых вариантах осуществления состояние представляет собой вирусную инфекцию, в частности, инфекцию вируса гриппа. В конкретных вариантах осуществления термин "заболевание" относится к патологическому состоянию в результате присутствия вируса в клетке или пациенте, или инвазии вируса в клетку или пациента. В некоторых вариантах осуществления состояние представляет собой заболевание у пациента, тяжесть которого уменьшают путем индуцирования иммунного ответа у пациента посредством введения иммуногенной композиции.

Применяемый в настоящем документе термин "эффективное количество" в контексте введения терапевтического средства пациенту относится к количеству терапевтического средства, которое имеет профилактический и/или терапевтический эффект (ы). В некоторых вариантах осуществления "эффективное количество" в контексте введения терапевтического средства пациенту относится к количеству терапевтического средства, которое является достаточным для достижения снижения или облегчения тяжести инфекции вируса гриппа, заболевания или симптома, связанного с ней, такого как, но без ограничения, снижение продолжительности инфекции вируса гриппа, заболевания или симптома, связанного с ней, предупреждение прогрессирования инфекции вируса гриппа, заболевания или симптома, связанного с ней, предупреждение развития или наступления или рецидива инфекции вируса гриппа, заболевания или симптома, связанного с ней, предупреждение или снижение распространения вируса гриппа от одного пациента к другому пациенту, сокращение случаев госпитализации пациента и/или длительности госпитализации, увеличение выживаемости пациента с инфекцией вируса гриппа или заболеванием, связанным с ней, устранение инфекции вируса гриппа или заболевания, связанного с ней, ингибирование или снижение репликации вируса гриппа, снижение титра вируса гриппа и/или усиление и/или улучшение профилактического или терапевтического эффекта (эффектов) другой терапии. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество не приводит к полной защите от заболевания вирусом гриппа, но приводит к более низкому титру или сниженному количеству вирусов гриппа по сравнению с необработанным пациентом. Преимущества снижения титра, количества или общей нагрузки вирусом гриппа включают, но без ограничения, меньшую тяжесть симптомов инфекции, меньшее количество симптомов инфекции и снижение длительности заболевания, связанного с инфекцией.

Подразумевают, что применяемое в настоящем документе выражение "хозяин" относится к организму или клетке, в которую был введен вектор, такой как вектор для клонирования или вектор экспрессии. Организм или клетка могут быть прокариотическими или

эукариотическими. Предпочтительно, хозяин включает выделенные клетки-хозяева, например, клетки-хозяева в культуре. Выражение "клетки-хозяева" означает лишь, что клетки модифицировали для (сверх)-экспрессии полипептидов по настоящему изобретению. Следует понимать, что выражение хозяин предназначено для обозначения не только определенного организма или клетки, но также и потомства такого организма или клетки. Поскольку вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды в последующих поколениях могут происходить определенные модификации, фактически, такое потомство может не быть идентичным родительскому организму или клетке, но его все еще включают в объем выражения "хозяин", применяемого в настоящем документе.

Полагают, что выражение "включенный" или "включая", применяемое в настоящем документе, следует сопровождать словами "без ограничения".

Применяемый в настоящем документе термин "инфекция" означает инвазию, размножение и/или присутствие вируса в клетке или пациенте. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой "активную" инфекцию, т.е. такую, при которой вирус реплицируется в клетке или пациенте. Такая инфекция характеризуется распространением вируса в другие клетки, ткани и/или органы из клеток, тканей и/или органов, изначально инфицированных вирусом. Инфекция также может быть латентной инфекцией, т.е. такой, при которой вирус не реплицируется. В некоторых вариантах осуществления инфекция относится к патологическому состоянию в результате присутствия вируса в клетке или пациенте, или инвазии вируса в клетку или пациента.

Вирусы гриппа классифицируют на типы вируса гриппа: род А, В и С. Выражение "подтип вируса гриппа", применяемое в настоящем документе, относится к вариантам вируса гриппа А, которые характеризуются комбинациями поверхностных вирусных белков - гемагглютинаина (H) и нейраминидазы (N). Согласно настоящему изобретению подтипы вируса гриппа могут быть названы по их номеру H, такому как, например, "вирус гриппа, содержащий HA подтипа H3", "вирус гриппа подтипа H3" или "грипп H3", или по

комбинации номера H и номера N, такой как, например, "подтип H3N2 вируса гриппа" или "H3N2". Термин "подтип" специфически включает все индивидуальные "штаммы" в пределах каждого подтипа, которые, как правило, являются результатом мутаций и показывают различные патогенные профили, в том числе, природные изоляты, а также искусственные мутанты или реассортанты и т.п. Такие штаммы также можно называть различными "изолятами" вирусного подтипа. Соответственно, применяемые в настоящем документе термины "штаммы" и "изоляты" можно применять взаимозаменяемо. Современная номенклатура штаммов или изолятов вируса гриппа человека включает тип (род) вируса, т.е. А, В или С, географическое местоположение первого выделения, номер штамма и год выделения, как правило, с антигенным описанием HA и NA, данным в скобках, например, A/Moscow/10/00 (H3N2). Не человеческие штаммы также включают в свою номенклатуру исходного хозяина. Подтипы вируса гриппа А можно дополнительно классифицировать, ссылаясь на их филогенетическую группу. Филогенетический анализ продемонстрировал подразделение гемагглютининов на две основные группы: *inter alia* подтипы H1, H2, H5 и H9 в филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1") и *inter alia* подтипы H3, H4, H7 и H10 в филогенетической группе 2 (вирусы гриппа "группы 2").

Применяемый в настоящем документе термин "заболевание, вызванное вирусом гриппа" относится к патологическому состоянию в результате присутствия вируса гриппа, например, вируса гриппа А или В, в клетке или пациенте, или инвазии вируса гриппа в клетку или пациент. В конкретных вариантах осуществления данный термин относится к респираторному заболеванию, вызванному вирусом гриппа.

Применяемый в настоящем документе термин "нуклеиновая кислота" предназначен для включения молекул ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекул РНК (например, мРНК) и аналогов ДНК и РНК, созданных с применением нуклеотидных аналогов. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть модифицированы химически или биохимически или могут содержать неприродные или

дериватизированные нуклеотидные основания, что будет совершенно понятно специалистам в данной области техники. Такие модификации включают, например, метки, метилирование, замену одного или нескольких природных нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как незаряженные связи (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т.д.), заряженные связи (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), выступающие фрагменты (например, полипептиды), интеркаляторы (например, акридин, псорален и т.д.), хелатирующие вещества, алкилирующие вещества и модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.). Упоминание последовательности нуклеиновой кислоты охватывает комплементарную ей цепь, если не указано иное. Таким образом, упоминание молекулы нуклеиновой кислоты с конкретной последовательностью следует понимать как охватывающее комплементарную ей цепь с ее комплементарной последовательностью. Комплементарная цепь также пригодна, например, для антисмысловой терапии, гибридизационных зондов и праймеров для PCR.

Применяемая в настоящем документе в некоторых вариантах осуществления нумерация аминокислот в HA основана на нумерации аминокислот в HA0 вируса гриппа дикого типа, например, нумерации аминокислот в штамме гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Применяемая в настоящем изобретении формулировка "аминокислота в положении "x" в HA", таким образом, означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении x в HA0 определенного вируса гриппа дикого типа, например, A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1; где аминокислоты домена HA2 были указаны курсивом). Специалисту в данной области техники будет понятно, что эквивалентные аминокислоты в других штаммах и/или подтипах вируса гриппа можно определить путем множественного выравнивания последовательностей. Необходимо отметить, что в системе нумерации, используемой в данной заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого белка HA0 (SEQ ID NO: 1). Зрелая последовательность начинается, например, с положения 18 SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области техники

будет понятно, что лидерная последовательность (или сигнальная последовательность), которая направляет транспорт белка в ходе продукции (например, соответствующая аминокислотам 1-17 SEQ ID NO: 1), обычно не присутствует в конечном полипептиде, который, например, применяют в вакцине. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению, таким образом, содержат аминокислотную последовательность без лидерной последовательности, т.е. эта аминокислотная последовательность основана на аминокислотной последовательности HA0 без сигнальной последовательности.

"Полипептид" относится к полимеру аминокислот, связанному амидными связями, как известно специалисту в данной области техники. Применяемый в настоящем документе термин может обозначать одиночную полипептидную цепь, связанную ковалентными амидными связями. Данный термин может также обозначать несколько полипептидных цепей, связанных нековалентными взаимодействиями, такими как ионные связи, водородные связи, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и гидрофобные связи. Специалистам в данной области техники будет понятно, что термин включает полипептиды, которые были модифицированы, например, путем посттрансляционного процессинга, такого как отщепление сигнального пептида, образование дисульфидных связей, гликозилирование (например, N-связанное и O-связанное гликозилирование), расщепление протеазой и липидная модификация (например, S-пальмитоилирование).

"Полипептид стеблевого домена" относится к полипептиду, который содержит одну или несколько полипептидных цепей, составляющих стеблевой домен природного (дикого типа) гемагглютинаина (HA). Как правило, полипептид стеблевого домена представляет собой одиночную полипептидную цепь (т.е. соответствует стеблевому домену полипептида гемагглютинаина HA0) или две полипептидные цепи (т.е. соответствует стеблевому домену полипептида гемагглютинаина HA1 в ассоциации с полипептидом гемагглютинаина HA2). Согласно настоящему изобретению полипептид стеблевого домена содержит одну или несколько мутаций по сравнению с молекулой HA дикого типа, в частности, один или несколько аминокислотных остатков HA дикого типа могут быть

замещены другими аминокислотами, которые не являются природными для соответствующего положения в определенном НА дикого типа. Полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению могут дополнительно содержать одну или несколько сшивающих последовательностей, описанных ниже.

Выражение "вектор" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена вторая молекула нуклеиновой кислоты для введения хозяину, где она будет реплицироваться и в некоторых случаях экспрессироваться. Другими словами, вектор может транспортировать молекулу нуклеиновой кислоты, к которой он был присоединен. Под применяемым в данном документе термином "вектор" подразумеваются векторы для клонирования, а также векторы экспрессии. Векторы включают, но без ограничений, плазмиды, космиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC), и дрожжевые искусственные хромосомы (YAC), и векторы, полученные из бактериофагов или вирусов растений или животных (в том числе человека). Векторы включают точку начала репликации, распознаваемую предполагаемым хозяином, и в случае векторов экспрессии хозяином могут распознаваться промоторные и другие регуляторные участки. Определенные векторы способны к автономной репликации в хозяине, в который они введены (например, векторы, имеющие бактериальное начало репликации, могут реплицироваться в бактериях). Другие векторы можно встроить в геном хозяина после введения в хозяина, и, таким образом, они могут реплицироваться наряду с геномом хозяина.

Применяемый в настоящем документе термин "дикого типа" в контексте вируса относится к вирусам гриппа, которые широко распространены, естественно циркулируют и производят типичные вспышки заболевания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Вирусы гриппа имеют значительное влияние на глобальное здравоохранение, вызывая миллионы случаев тяжелого заболевания каждый год, тысячи смертей и значительные экономические потери. Современные трехвалентные противогриппозные вакцины вызывают мощный ответ нейтрализующих антител к вакцинным штаммам и близкородственным изолятам, но редко распространяются на более

отличающиеся штаммы в пределах подтипа или на другие подтипы. Кроме того, выбор соответствующих вакцинных штаммов представляет много сложностей и часто приводит к недостаточной защите. Более того, прогнозирование подтипа следующего пандемического вируса, в том числе, когда и где он возникнет, в настоящее время невозможно.

Гемагглютинин (НА) является основным гликопротеином оболочки вирусов гриппа А, который представляет собой главную мишень нейтрализующих антител. Гемагглютинин имеет две главные функции в процессе проникновения. Во-первых, гемагглютинин опосредует прикрепление вируса к поверхности клеток-мишеней благодаря взаимодействию с сиаловой кислотой рецепторов. Во-вторых, после эндоцитоза вируса гемагглютинин в дальнейшем инициирует слияние вирусной и эндосомальной мембран для высвобождения вирусного генома в цитоплазму клетки-мишени. НА содержит крупный эктодомен из ~ 500 аминокислот, который расщепляется ферментами хозяина с образованием 2 полипептидов, остающихся связанными дисульфидной связью. Большая часть N-концевого фрагмента (НА1, 320-330 аминокислот) образует дистальный мембранный глобулярный домен, который содержит рецептор-связывающий сайт и большинство детерминант, распознаваемых нейтрализующими вирус антителами. Меньшая С-концевая часть (НА2, ~180 аминокислот) образует стеблеподобную структуру, которая прикрепляет глобулярный домен к клеточной или вирусной мембране. Степень гомологии последовательности между подтипами меньше в полипептидах НА1 (34%-59% гомологии между подтипами), чем в полипептиде НА2 (51%-80% гомологии). Наиболее консервативный участок представляет собой последовательность вблизи сайта расщепления, в частности, 23 N-концевые аминокислоты НА2, которая является консервативной во всех подтипах вируса гриппа А (Lorieau et al., 2010). Часть этого участка располагается в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице НА (НА0), но становится недоступной после расщепления НА0 на НА1 и НА2.

Большинство нейтрализующих антител связывается с петлями, которые окружают сайт связывания рецептора и мешают связыванию рецептора и прикреплению. Так как эти петли являются

высоковариабельными, большинство антител, направленных на эти участки, являются штамм-специфичными, что объясняет почему современные вакцины вызывают такой ограниченный штамм-специфичный иммунитет. Недавно, однако, были созданы полные человеческие моноклональные антитела против гемагглютинина вируса гриппа с перекрестно-нейтрализующей активностью широкого спектра. Функциональный и структурный анализ показал, что эти антитела препятствуют процессу слияния мембран и направлены против высоко консервативных эпитопов в стеблевом домене белка НА вируса гриппа (Throsby et al., 2008; Ekiert et al. 2009, WO 2008/028946, WO2010/130636, WO 2013/007770).

Полипептиды стеблевого домена, стабильно представляющие эпитопы этих антител, описаны в находящейся одновременно на рассмотрении заявке на патент PCT/EP2012/073706. По меньшей мере некоторые из полипептидов стеблевого домена, описанные в настоящем документе, стабильно представляют эпитоп CR6261 и/или CR9114 и являются иммуногенными у мышей. По меньшей мере некоторые из полипептидов стеблевого домена, описанные в настоящем документе, стабильно представляют эпитоп CR8020 и являются иммуногенными у мышей.

По настоящему изобретению были сконструированы новые полипептиды стеблевого домена НА, представляющие эти эпитопы. Эти полипептиды могут быть использованы для создания универсальной вакцины на основе эпитопов, индуцирующей защиту против широкого круга штаммов гриппа. Как и в ранее описанных полипептидах стеблевого домена, высоковариабельную и иммунодоминантную часть, т.е. головной домен, сначала удаляют из полноразмерной молекулы НА для создания полипептида стеблевого домена, также называемого мини-НА, чтобы перенаправить иммунный ответ на стеблевой домен, где расположены эпитопы для нейтрализующих антител широкого спектра. Нейтрализующие антитела широкого спектра, упомянутые выше, использовали для проверки правильной укладки вновь созданных молекул и для подтверждения наличия нейтрализующих эпитопов.

Новые полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению показывают увеличенное связывание антител, в

частности CR6261 и/или CR9114, по сравнению со связыванием этих антител со стеблевыми полипептидами, описанными ранее (PCT/EP2012/073706).

Полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению способны представлять консервативные эпитопы проксимального мембранного стеблевого домена молекулы HA иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, которые представлены в дистальном мембранном головном домене. С этой целью часть первичной последовательности белка HA0, составляющую головной домен, удаляют и заново соединяют, либо непосредственно, либо в некоторых вариантах осуществления посредством введения короткой гибкой сшивающей последовательности ("линкера") с восстановлением непрерывности аминокислотной цепи. Полученную полипептидную последовательность дополнительно модифицируют путем введения специфических мутаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы HA0.

Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает полипептиды, содержащие (a) домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1, и (b) домен HA2 гемагглютинаина вируса гриппа, где полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина устойчивы к расщеплению протеазой на стыке между HA1 и HA2, и где одна или несколько аминокислот в домене HA1 и HA2 были мутированы. В полипептидах по настоящему изобретению домены HA1 и HA2, таким образом, содержат одну или несколько мутаций по сравнению с доменами HA1 и HA2 гемагглютинаина вируса гриппа дикого типа, на котором основан полипептид стеблевого домена HA.

Согласно настоящему изобретению полипептиды стеблевого домена основаны на HA вируса гриппа, содержащего HA подтипа H1.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат одну или несколько мутаций в положении 337, 340, 352 или 353 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентных положениях в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по

настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 352 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 353 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 337 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 340 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат одну или несколько мутаций в аминокислотной последовательности HA2, соединяющей С-концевой остаток спирали А с N-концевым остатком спирали CD, как показано на ФИГ. 1.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в положении 402, 406, 409, 413 и 416 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) или в эквивалентных положениях в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 402 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 406 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 409 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 413 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 416 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

Полипептиды по настоящему изобретению не содержат полноразмерный HA1.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные полипептиды являются существенно меньшими, чем HA0, предпочтительно в них отсутствует вся или фактически вся глобулярная головка HA. Предпочтительно, иммуногенные полипептиды составляют не более чем 360, предпочтительно не более чем 350, 340, 330, 320, 310, 305, 300, 295, 290, 285, 280, 275 или 270 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные полипептиды составляют от приблизительно 250 до приблизительно 350, предпочтительно от приблизительно 260 до приблизительно 340, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды дополнительно содержат одну или несколько дополнительных мутаций в домене HA1 и/или HA2, по сравнению с аминокислотной последовательностью HA, из которой получены домены HA1 и HA2. Таким образом, стабильность стеблевых полипептидов дополнительно увеличена.

Согласно настоящему изобретению "N-концевой сегмент HA1" относится к полипептидному сегменту, который соответствует амино-концевому участку домена HA1 молекулы гемагглютинаина (HA) гриппа. В некоторых вариантах осуществления N-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты с положения 1 по положение x домена HA1, где аминокислота в положении x представляет собой аминокислотный остаток в пределах HA1. Выражение "C-концевой сегмент HA1" относится к полипептидному

сегменту, который соответствует карбокси-концевому участку домена HA1 гемагглютинаина вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления С-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты с положения y до С-концевой аминокислоты, включительно, домена HA1, где аминокислота в положении y представляет собой аминокислотный остаток в пределах HA1. Согласно настоящему изобретению y больше, чем x , таким образом сегмент домена HA1 между N-концевым сегментом HA1 и С-концевым сегментом HA1, т.е. между аминокислотой в положении x и аминокислотой в положении y HA1, был удален и в некоторых вариантах осуществления замещен сшивающей последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислоты 1- x HA1 и С-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит y -конец аминокислоты HA1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления делеция в сегменте HA1 включает аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении $x+1$ вплоть до аминокислоты в положении $y-1$, включительно.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 содержит аминокислоту p - x HA1, где p представляет собой первую аминокислоту зрелой молекулы HA (например, $p=18$ в случае SEQ ID NO: 1). Специалист в данной области сможет подготовить полипептиды, описанные в настоящем документе, без сигнальных пептидов (например, аминокислот 1-17 SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению не содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная и трансмембранная последовательность, например, аминокислотная последовательность от положения (или эквивалентного ему) 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 526, 528, 529 или 530 домена HA2 до С-конца домена HA2 была удалена.

Согласно настоящему изобретению полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина являются устойчивыми к расщеплению протеазой на стыке между HA1 и HA2. Специалистам в данной области техники известно, что последовательность Arg (R) - Gly (G), соединяющая HA1 и HA2, представляет собой сайт распознавания для трипсина и трипсиноподобных протеаз и, как правило, расщепляется для активации гемагглютинаина. Поскольку полипептиды стеблевого домена HA, описанные в настоящем документе, не должны быть активированы, полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина по настоящему изобретению являются устойчивыми к расщеплению протеазой. Согласно настоящему изобретению, таким образом, сайт для расщепления протеазой удаляют или сайт протеазы, соединяющий HA1 и HA2, мутируют до последовательности, которая является устойчивой к расщеплению протеазой.

В некоторых вариантах осуществления С-концевой аминокислотный остаток в С-концевом стеблевом сегменте HA1 представляет собой любую аминокислоту, кроме аргинина (R) или лизина (K). В некоторых вариантах осуществления С-концевая аминокислота в HA1 представляет собой глутамин (Q), серин (S), треонин (T), аспарагин (N), аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E). В некоторых вариантах осуществления С-концевой аминокислотный остаток в С-концевом стеблевом сегменте HA1 представляет собой глутамин (Q).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды гликозилированы.

Согласно настоящему изобретению полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа основаны на HA вирусом гриппа подтипа H1. Под выражением "на основе" следует понимать, что N-концевые сегменты и/или С-концевые сегменты домена HA1 и/или домена HA2 имеют по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности аминокислотной последовательности с соответствующими N-концевыми и/или С-концевыми сегментами доменов HA1 и/или HA2 любого природного гемагглютинаина вируса гриппа подтипа H1, H3 и/или H5, известного специалистам в данной области техники или обнаруженного позже. В

некоторых вариантах осуществления полипептиды стеблевого домена гемагглютини́на основаны на гемагглютинине гриппа из группы 1 вируса гриппа А.

Согласно настоящему изобретению полипептиды основаны на НА Н1, т.е. НА, содержащем аминокислотную последовательность вируса гриппа подтипа Н1. В конкретном варианте осуществления полипептиды содержат стеблевые домены гемагглютини́на из или на основе НА вируса гриппа А, включая НА из подтипа Н1, например, из вируса гриппа А/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 1), как описано ниже. Специалисту в данной области техники будет понятно, что и другие вирусы гриппа А, содержащие НА из подтипа Н1, можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат стеблевые домены гемагглютини́на на основе НА из вируса гриппа А Н1, выбранного из Таблицы 3.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат N-концевой полипептидный сегмент НА1, содержащий аминокислоты с положения 1 по положение x домена НА1 Н1, где x обозначает любую аминокислоту между аминокислотой в положении 46 и аминокислотой в положении 60, такую как аминокислота в положении 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 59, предпочтительно, где x представляет собой 52, 53, 55 или 59. Предпочтительно, полипептиды содержат N-концевой сегмент НА1 без сигнальной последовательности, т.е. N-концевой сегмент НА1, содержащий аминокислоты с положения 18 (например, для НА Н1, такого как SEQ ID NO: 1) или эквивалентного положения в других штаммах вируса гриппа Н1 (см., например, Таблицу 3), по положение x домена НА1. В некоторых вариантах осуществления N-концевой сегмент НА1, таким образом, содержит аминокислоты с положения p (где p=18 для НА Н1 в SEQ ID NO: 1 или эквивалентное положение в других НА Н1) по положение x домена НА1.

В некоторых вариантах осуществления C-концевой полипептидный сегмент НА1 содержит аминокислоты от положения y до C-концевой аминокислоты, включительно, домена НА1 Н1, где y представляет собой любую аминокислоту между аминокислотой в положении 290 и аминокислотой в положении 325 НА1 НА, предпочтительно, где y

представляет собой 291, 303, 318 или 321.

В некоторых вариантах осуществления x представляет собой 52 и y представляет собой 321.

Согласно настоящему изобретению стеблевые полипептиды содержат одну или несколько мутаций, т.е. аминокислотных замен в домене HA1 и/или домене HA2, по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего HA1 и/или HA2 домена вируса гриппа дикого типа, т.е. вируса гриппа, на котором основаны стеблевые полипептиды.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков рядом с сайтом расщепления HA0 (остаток 343 в SEQ ID NO: 1) были мутированы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков в положении 337, 340, 352 или 353 в SEQ ID NO: 1 или эквивалентных положениях в других вирусах гриппа были мутированы, т.е. заменены аминокислотой, которая не встречается в соответствующем положении в аминокислотной последовательности HA вируса гриппа дикого типа, на котором основан стеблевой полипептид. В Таблице 7 показана природная вариабельность аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 352 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 353 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 337 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну мутацию в положении 340 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении в других вирусах гриппа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат

одну или несколько мутаций, указанных в Таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления мутированный аминокислотный остаток в положении 337 (домен HA1) выбран из группы, состоящей из I, E, K, V, A и T.

В некоторых вариантах осуществления мутированный аминокислотный остаток в положении 340 (домен HA1) выбран из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y.

В некоторых вариантах осуществления мутированный аминокислотный остаток в положении 352 (домен HA2) выбран из группы, состоящей из D, V, Y, A, I, N, S и T.

В некоторых вариантах осуществления мутированный аминокислотный остаток в положении 353 (домен HA2) выбран из группы, состоящей из K, R, T, E, G и V.

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота вводит консенсусное N-гликозилирование, например N-X-T/S (где X обозначает любую природную аминокислоту, кроме P) в последовательность, как это, например, имеет место для I340N в SEQ ID NO: 6

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота представляет собой аминокислоту, которая не встречается в природе в последовательностях того же подтипа.

Необходимо снова отметить, что нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в HA0 H1, в частности, на нумерации аминокислот в штамме гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Специалист в данной области техники сможет определить эквивалентные аминокислоты в HA из других вирусов гриппа и таким образом будет иметь возможность определить эквивалентные мутации, см., например, Таблицу 3 для выравнивания последовательностей различных вирусов гриппа H1.

В некоторых вариантах осуществления домен HA2 содержит одну или несколько мутаций в аминокислотной последовательности HA2, соединяющей C-концевой остаток спирали A с N-концевым остатком спирали CD (ФИГ. 1). Аминокислотная последовательность HA2 H1, соединяющая C-концевой остаток спирали A и N-концевой остаток спирали CD, содержит аминокислотную последовательность, содержащую остатки 402-418 гриппа HA (нумерация согласно SEQ ID

NO: 1), содержащую аминокислотную последовательность MNTQFTA₁VGKEFN (H/K) LE (K/R) (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, соединяющая С-концевой остаток спирали А с N-концевым остатком спирали CD, т.е. участок, содержащий аминокислотные остатки 402-418 гриппа HA серотипа H1 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), содержит аминокислотную последовательность

X₁NTQX₂TAX₃GKEX₄N (H/K) X₅E (K/R) (SEQ ID NO: 52).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат одну или несколько мутаций в домене HA2 H1, указанных в Таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в положении 402, 406, 409, 413 и 416 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1), т.е. одна или несколько аминокислот X₁, X₂, X₃, X₄ и X₅ были мутированы, т.е. содержат аминокислоту, которая не встречается в этих положениях в вирусе гриппа дикого типа, на котором основан стеблевой полипептид.

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота в положении 402, т.е. X₁, представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R и T.

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота в положении 406, т.е. X₂, представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, T, H, L и Y, предпочтительно I, L или Y.

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота в положении 409, т.е. X₃, представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V, A, G, I, R, F и S, предпочтительно A, I или F.

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота в положении 413, т.е. X₄, представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, E, K, M и V, предпочтительно I, Y, M или V.

В некоторых вариантах осуществления мутированная аминокислота в положении 416, т.е. X₅, представляет собой

аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L, H, I, N, R, предпочтительно I.

Комбинации этих мутаций также возможны.

В некоторых вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислотные остатки 1-52 HA1, предпочтительно аминокислотные остатки 18-52 HA1, и C-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислотные остатки 321-343 HA1, где аминокислота в положении 343, т.е. R343, была мутирована и представляет собой любую аминокислоту кроме R, предпочтительно глутамин (Q). В некоторых вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 состоит из аминокислотных остатков 1-52 HA1, предпочтительно из аминокислотных остатков 18-52 HA1, и C-концевой стеблевой сегмент HA1 состоит из аминокислотных остатков 321-343 HA1.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды селективно связываются с антителами CR6261 и/или CR9114. В одном варианте осуществления полипептид не связывается с антителом CR8057. В одном варианте осуществления CR6261 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CR9114 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления CR8057 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Как описано выше, полипептиды содержат домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1. Сшивающая последовательность не встречается в природном HA или в HA дикого типа. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептид,

который содержит один аминокислотный остаток, два или менее аминокислотных остатка, три или менее аминокислотных остатка, четыре или менее аминокислотных остатка, пять или менее аминокислотных остатков, десять или менее аминокислотных остатков, 15 или менее аминокислотных остатков, или 20 или менее аминокислотных остатков, или 30 или менее аминокислотных остатков, или 40 или менее аминокислотных остатков, или 50 или менее аминокислотных остатков. В конкретном варианте осуществления сшивающая последовательность представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из G, GS, GGG, GSG, GSA, GSGS, GSAG, GGGG, GSAGS, GSGSG, GSAGSA, GSAGSAG и GSGSGSG.

В некоторых вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 непосредственно связан с C-концевым сегментом HA1, т.е. полипептиды не содержат сшивающую последовательность.

Согласно настоящему изобретению удаления сайта расщепления между HA1 и HA2 можно достичь посредством мутации R (в небольшом ряде случаев K) на Q в положении P1 (см., например, Sun et al., 2010 для объяснения номенклатуры сайта расщепления (положение 343 в SEQ ID NO: 1). Мутация на Q является предпочтительной, но S, T, N, D или E являются альтернативными.

Согласно настоящему изобретению один или несколько дисульфидных мостиков вводят в полипептиды стеблевого домена, предпочтительно между аминокислотами в (или эквивалентно) положении 324 и 436 в H1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления полипептиды, таким образом, дополнительно содержат мутацию R324C в домене HA1 и T436C в домене HA2. Специалист в данной области техники может легко определить эквивалентные положения путем выравнивания последовательностей с помощью подходящего алгоритма, такого как Clustal, Muscle и т.д. Сконструированные дисульфидные мостики создают путем мутирования по меньшей мере одного (если другой уже является цистеином), но обычно двух остатков, которые пространственно близки, в цистеин, который будет спонтанно или путем активного окисления образовывать ковалентную связь между атомами серы этих остатков.

HA гриппа в своей нативной форме существует в виде тримера на клеточной или вирусной мембране. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточную и трансмембранную последовательность удаляют, так что секретируемый (растворимый) полипептид получают после экспрессии в клетках. Способы для экспрессии и очистки секретируемых эктодоменов HA были описаны (см., например, Dopheide et al., 2009; Ekiert et al., 2009, 2011; Stevens et al., 2004, 2006; Wilson et al., 1981). Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти способы можно также применить непосредственно к полипептидам стеблевого домена по настоящему изобретению для достижения экспрессии секретируемого (растворимого) полипептида. Таким образом, эти полипептиды также охвачены в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления внутриклеточная и трансмембранная последовательности, например, аминокислотная последовательность от положения (или эквивалентного ему) 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529 или 530 домена HA2 до С-конца домена HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) были удалены с получением растворимого полипептида после экспрессии в клетках.

В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид по настоящему изобретению можно создать путем делеции полипептидной последовательности от остатка (эквивалента) 514 до С-конца (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), в качестве альтернативы, дополнительные остатки можно включить в полипептид по настоящему изобретению, например, путем делеции последовательности от остатка 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523. Последовательность his-метки (ННННН (SEQ ID NO: 20) или НННННН (SEQ ID NO: 21)) можно добавить с целью очистки, необязательно присоединенную посредством линкера. Линкер необязательно может содержать сайт протеолитического расщепления для ферментативного удаления his-метки после очистки.

В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид по настоящему изобретению можно создать путем делеции

полипептидной последовательности с остатка (эквивалента) 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531 или 532 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1). Последовательность his-метки (НННННН (SEQ ID NO: 20) или НННННН (SEQ ID NO: 21)) можно добавить с целью очистки, необязательно присоединенную посредством линкера. Линкер необязательно может содержать сайт протеолитического расщепления для удаления his-метки после очистки.

Растворимые полипептиды можно дополнительно стабилизировать путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, такой как последовательность-фолдон (например, описанная в настоящем документе). Полипептиды, полученные, как описано выше, также охвачены в настоящем изобретении.

Нативный НА существует в виде тримера на клеточной поверхности. Большинство взаимодействий между отдельными мономерами, которые удерживают тример вместе, расположены в головном домене, в то время как в стеблевом домене тримеризация опосредована образованием тримерного биспирального мотива. После удаления головки третичная структура дестабилизируется и, следовательно, необходимы модификации для того, чтобы повысить стабильность белка. Путем укрепления предрасположенности к спиралеобразованию спирали CD можно создать более стабильный белок. В некоторых вариантах осуществления последовательность МКQIEDKIEEIESKQ (SEQ ID NO: 5), полученную из GCN4 и также известную, как тримеризующая, вводят в (эквивалентное) положение 419-433.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды дополнительно стабилизируют путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), с C-конца НА2, необязательно присоединенной посредством линкера. Линкер может факультативно содержать сайт расщепления для последующей обработки согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Для облегчения очистки растворимой формы можно добавить последовательность метки, например, his-метки (НННННН (SEQ ID NO: 20) или НННННН (SEQ ID NO: 21)) или FLAG-

метки (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 22) или их комбинации, необязательно присоединенной посредством коротких линкеров. Линкер может факультативно содержать сайт (часть сайта) протеолитического расщепления, например, RSLVPR (SEQ ID NO: 23) (тромбин) или IEGR (SEQ ID NO: 24) (фактор X) для последующей обработки согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Обработанные белки также охвачены в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2 с положения 520-565 была удалена (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) и замещена на

SGRDYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGNHNNNN (SEQ ID NO: 4).

Заявители ранее выявили нейтрализующие антитела широкого спектра, выделенные из первичных В-клеток человека от вакцинированных индивидуумов, некоторые из них были специфическими для группы 1 (например, CR6261, как описано в WO 2008/028946), а некоторые из них были специфическими для группы 2 вирусов гриппа (например, CR8020, как описано в WO 2010/130636). Детальный анализ эпитопов этих моноклональных антител показал причину отсутствия перекрестной реактивности этих специфических антител. В обоих случаях наличие гликанов в группе 1 или группе 2 молекул HA в различных положениях по меньшей мере частично объяснило тот факт, что антитела являются группо-специфичными. После выявления CR9114-подобных антител, которые перекрестно реагируют со многими молекулами HA группы 1 и 2, как описано ниже, стало ясно, что иммунная система человека может вызвать нейтрализующие антитела очень широкого спектра против вирусов гриппа. Однако, учитывая необходимость в схеме ежегодной вакцинации, эти антитела по-видимому отсутствуют или только в очень низкой степени возникают после заражения или вакцинации (сезонными) вирусами гриппа подтипов H1 и/или H3.

По настоящему изобретению предусмотрены полипептиды, которые имитируют специфические эпитопы CR6261 и/или CR9114, и которые могут быть использованы в качестве иммуногенных полипептидов, например, чтобы вызвать перекрестно нейтрализующие антитела при

введении *in vivo*, либо отдельно, либо в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими методами лечения. Под "перекрестно нейтрализующими антителами" подразумевают антитела, которые способны нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 1 и/или по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 2 и/или по меньшей мере два различных подтипа вирусов гриппа В, в частности, по меньшей мере все штаммы вируса, которые нейтрализуются с помощью CR6261 и CR9114.

Полипептиды по настоящему изобретению не содержат полноразмерный HA1. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные полипептиды являются существенно меньшими, чем HA0, предпочтительно в них отсутствует вся или фактически вся глобулярная головка HA. Предпочтительно, иммуногенные полипептиды составляют не более чем 360, предпочтительно не более чем 350, 340, 330, 320, 310, 305, 300, 295, 290, 285, 280, 275 или 270 аминокислот в длину. В одном варианте осуществления иммуногенный полипептид составляет от приблизительно 250 до приблизительно 350, предпочтительно от приблизительно 260 до приблизительно 340, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды селективно связываются с антителами CR6261 и/или CR9114. В некоторых вариантах осуществления полипептид не связывается с антителом CR8057. CR6261 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CR9114 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CR8020 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. CR8057 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Как описано выше, полипептиды содержат домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1. Сшивающая последовательность, если присутствует, не встречается в природном HA или HA дикого типа. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептид, который содержит один аминокислотный остаток, два или менее аминокислотных остатка, три или менее аминокислотных остатка, четыре или менее аминокислотных остатка, пять или менее аминокислотных остатков, десять или менее аминокислотных остатков, 15 или менее аминокислотных остатков, или 20 или менее аминокислотных остатков, или 30 или менее аминокислотных остатков, или 40 или менее аминокислотных остатков, или 50 или менее аминокислотных остатков. В конкретном варианте осуществления сшивающая последовательность представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из G, GS, GGG, GSG, GSA, GSGS, GSAG, GGGG, GSAGS, GSGSG, GSAGSA, GSAGSAG и GSGSGSG.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN X_1 PS X_2 QSQGLFGAIAG X_3 X_4 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK X_5 NTQ X_6 TAX X_7 GKE X_8 NK X_9 ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ L KNNAKEIGNGCFEFYHNKCNDCEMESVKN G TYDYPKYSEESKLNREKIDGVSGRDYKDDD
DKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG E WLLSTFLGHHHHHH (SEQ ID NO: 53),

где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;

X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRN**X**₁PS**X**₂QSQGLFGAIAG**X**₃**X**₄EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK**X**₅NTQ**X**₆TAX**X**₇GKE**X**₈NK**X**₉ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECME SVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDG (SEQ ID NO: 54),

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;

X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы,

состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN**X**₁PS**X**₂QSQGLFGAIAG**X**₃**X**₄EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK**X**₅NTQ**X**₆TAX**X**₇GKE**X**₈NK**X**₉ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG (SEQ ID NO: 70),

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T; X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN**X**₁PS**X**₂QSQGLFGAIAG**X**₃**X**₄EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK**X**₅NTQ**X**₆TAX**X**₇GKE**X**₈NK**X**₉ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 71),

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы,

состоящей из E, I, K, V, A и T;

X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

Полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа можно получить согласно любому методу, который считается приемлемым для специалиста, включая методы, описанные ниже.

Таким образом, иммуногенные полипептиды по настоящему изобретению можно синтезировать в виде последовательностей ДНК стандартными способами, известными в данной области техники, и клонировать, а затем экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с применением приемлемых ферментов рестрикции и способов, известных в данной области техники. Настоящее изобретение, таким образом, также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим описанные выше полипептиды. Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению является частью вектора, например, плазмиды. Такими векторами можно легко манипулировать с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и например, их можно сконструировать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или

эукариотических клетках. Кроме того, многие векторы можно непосредственно или в форме выделенного из него необходимого фрагмента использовать для трансформации эукариотических клеток и интегрировать целиком или частично в геном таких клеток, получая стабильные клетки-хозяева, содержащие необходимую нуклеиновую кислоту в своем геноме. Используемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно использовать для транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. При использовании клеток-хозяев предпочтительно, чтобы вектор представлял собой интегрирующий вектор. В качестве альтернативы, вектор может быть эписомально реплицирующимся вектором.

Специалист в данной области техники способен выбрать приемлемые векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению функциональным образом. Чтобы получить экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, специалистам в данной области техники хорошо известно, что последовательности, способные управлять экспрессией, можно функционально связать с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, с получением рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих белок или полипептид в экспрессируемом формате. В целом, промоторную последовательность помещают выше последовательностей, которые должны экспрессироваться. Многие векторы экспрессии доступны в данной области, например серии векторов pсDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyг от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т.д., которые можно использовать для получения приемлемых промоторов и/или последовательностей терминатора транскрипции, последовательностей полиаденилирования и т.п. Если последовательность, кодирующая полипептид, представляющий интерес, вставлена правильно относительно последовательностей, регулирующих транскрипцию и трансляцию кодируемого полипептида, полученная кассета экспрессии пригодна для получения полипептида, представляющего интерес, что называется экспрессией. Последовательности, управляющие экспрессией, могут

включать в себя промоторы, энхансеры и т.п., а также их комбинации. Они должны быть способными функционировать в клетке-хозяине, тем самым управляя экспрессией последовательностей нуклеиновых кислот, которые функционально связаны с ними. Специалист в данной области осведомлен о том, что разные промоторы можно использовать для обеспечения экспрессии гена в клетках-хозяевах. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемые, и их можно получать из разных источников, в том числе, вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или получать искусственным путем. Экспрессия нуклеиновых кислот, представляющих интерес, может быть за счет природного промотора или его производного, или за счет полностью гетерологичного промотора (Kaufman, 2000). Некоторые хорошо известные и наиболее используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как немедленный ранний (IE) промотор CMV (называемый в настоящем документе как промотор CMV) (получаемый, например, из pcDNA, Invitrogen), промоторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40) (Das et al., 1985), и т.п. Подходящие промоторы можно также получить из эукариотических клеток, такие как промоторы гена металлотioneина (MT), промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1 α) (Gill et al., 2001), промотор гена убиквитина C или UB6 (Gill et al., 2001), промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов теплового шока и т.п. Испытание промоторной функции и силы промотора является стандартной практикой для специалиста в данной области техники и в целом может, например, включать в себя клонирование исследуемого гена, такого как lacZ, люцифераза, GFP и т.д., после промоторной последовательности и проверку экспрессии исследуемого гена. Конечно, промоторы можно изменять посредством делеции, добавления, мутации последовательностей в них и проверять на функциональность с обнаружением новых, ослабленных или улучшенных промоторных последовательностей. Согласно настоящему изобретению сильные

промоторы, которые дают высокие уровни транскрипции в выбранных эукариотических клетках, являются предпочтительными.

Конструкции могут быть трансфицированы в эукариотические клетки (например растительные, грибковые, дрожжевые или животные клетки) или приемлемые прокариотические системы экспрессии, такие как *E.coli*, с применением способов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых случаях приемлемую последовательность "метки" (такой как, например, но без ограничения, *his-*, *myc-*, *strep-* или *flag-*метка) или полного белка (такого как, например, но без ограничения, мальтозу связывающий белок или глутатион-S-трансфераза) можно добавить к последовательностям по настоящему изобретению для обеспечения очистки и/или идентификации полипептидов из клеток или супернатанта. Необязательно последовательность, содержащую специфический протеолитический сайт, можно включить для последующего удаления метки путем протеолитического расщепления.

Очищенные полипептиды можно анализировать с помощью спектроскопических способов, известных в данной области техники (например, спектроскопии кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, ЯМР-спектроскопии или рентгеновской кристаллографии) для исследования наличия необходимых структур, таких как спирали и бета-складчатости. ELISA, Octet и FACS и т.п. можно использовать для исследования связывания полипептидов по настоящему изобретению с нейтрализующими антителами широкого спектра, описанными ранее (CR6261, CR9114, CR8057). Таким образом, можно выбирать полипептиды согласно настоящему изобретению, имеющие правильную конформацию.

Настоящее изобретение дополнительно относится к иммуногенным композициям, содержащим терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из полипептидов и/или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат полипептиды, содержащие стеблевые домены гемагглютинаина из (или на основе) HA одного подтипа гриппа, например, на основе HA вируса гриппа, содержащего HA, например, из подтипа H1 или H3. В некоторых вариантах осуществления

композиции содержат полипептиды, содержащие стеблевые домены гемагглютинаина на основе НА из двух или более различных подтипов гриппа, например, композиции, содержащие одновременно полипептиды, содержащие стеблевые домены гемагглютинаина на основе НА из подтипа Н1, и полипептиды, содержащие стеблевые домены гемагглютинаина на основе НА из подтипа Н3.

Иммуногенные композиции предпочтительно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем контексте выражение "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель в используемых дозах и концентрациях не вызовет нежелательных или опасных эффектов у пациентов, которым его ввели. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Novgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, наполнителю или инертной среде, с которым вводят композицию. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина можно, например, использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Точный состав должен соответствовать способу введения. Полипептиды и/или молекулы нуклеиновых кислот предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора. Стерильные растворы получают путем стерильной фильтрации или с помощью других способов, широко известных из уровня техники. Затем растворы можно лиофилизировать или разливать по контейнерам для лекарственных форм. рН раствора обычно находится в диапазоне от рН 3,0 до рН 9,5, например, от рН 5,0 до рН 7,5.

Настоящее изобретение также относится к полипептидам стеблевого домена НА гриппа, молекулам нуклеиновых кислот и/или векторам, описанным выше, для применения в индуцировании иммунного ответа против белка НА гриппа. Настоящее изобретение также относится к способам индуцирования иммунного ответа у

пациента, при этом способ включает введение пациенту молекулы полипептида, нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции, описанной выше. Пациент согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой млекопитающее, которое способно инфицироваться возбудителем инфекции, вызывающим заболевание, в частности, вирусом гриппа, или может иным образом получить пользу от индукции иммунного ответа, таким пациентом, например, может быть грызун, например, мышь, хорек или домашнее или сельскохозяйственное животное, или примат, кроме человека, или человек. Предпочтительно пациент представляет собой пациента-человека. Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает способы индуцирования иммунного ответа на гемагглютинин (НА) вируса гриппа, в частности, вируса гриппа А группы 1 и/или группы 2, такого как вирус гриппа, содержащий НА из подтипа Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н7 и/или Н10, и/или вируса гриппа В, у пациента с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ эффективно предупреждает и/или лечит инфекцию вируса гриппа, вызванную подтипами вируса гриппа А группы 1, и/или группы 2, и/или вирусами гриппа В. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный полипептидами, нуклеиновыми кислотами и/или иммуногенными композициями, описанными в настоящем документе, эффективно предупреждает и/или лечит инфекцию вируса гриппа А и/или В, вызванную двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью подтипами вируса гриппа А и/или В.

Поскольку хорошо известно, что небольшие белки и/или молекулы нуклеиновых кислот не всегда эффективно индуцируют мощный иммунный ответ, может быть необходимо увеличить иммуногенность полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот путем добавления адъюванта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, содержат или вводятся в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с композицией, описанной в настоящем документе, можно вводить до, одновременно с или после введения указанной композиции. Примеры приемлемых адъювантов включают

соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; масло-эмульсионные композиции (или композиции масло-в-воде), в том числе эмульсии сквален-вода, такие как MF59 (см., например WO 90/14837); составы сапонины, такие как, например QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, патент США № 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфориллипид А (MPL), 3-О-деацетилованный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, АДФ-рибозилированные бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин СТ, коклюшный токсин РТ или столбнячный анатоксин ТТ, Matrix М (Isconova). Кроме того, можно использовать известные иммуностимулирующие технологии, такие как гибридизация полипептидов по настоящему изобретению с белками, известными из уровня техники как повышающие иммунный ответ (например, столбнячный анатоксин, CRM197, rСТВ, бактериальные флагеллины или другие), или включение полипептидов в виросомы, или их комбинации. Другими неограничивающими примерами, которые можно применить, являются, например, раскрытые Coffman et al. (2010).

В одном варианте осуществления полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа по настоящему изобретению включены в векторы из вирусоподобных частиц (VLP). VLP обычно содержат вирусный полипептид (полипептиды), как правило, полученный из структурного белка (белков) вируса. Предпочтительно, VLP не способны к репликации. В некоторых вариантах осуществления VLP могут не иметь полного генома вируса или могут содержать часть генома вируса. В некоторых вариантах осуществления VLP не способны инфицировать клетку. В некоторых вариантах осуществления VLP экспрессируют на своей поверхности один или несколько вирусных (например, гликопротеин вирусной поверхности) или невирусных (например, антитело или белок) направляющих фрагментов, известных специалисту в данной области техники.

В конкретном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению включен в виросому. Виросому, содержащую полипептид согласно настоящему изобретению, можно получить с помощью

методов, известных специалисту в данной области техники. Например, вирусому можно получить путем разрушения очищенного вируса, извлечения генома и повторной сборки частиц с вирусными белками (например, полипептидом стеблевого домена гемагглютинина) и липидами с образованием липидных частиц, содержащих вирусные белки.

Настоящее изобретение также относится к описанным выше полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для индуцирования иммунного ответа у пациента против гриппа НА, в частности, для применения в качестве вакцины. Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды, или векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты или полипептиды, описанные в настоящем документе, таким образом, можно использовать для того, чтобы вызывать нейтрализующие антитела против вирусов гриппа, например, против стеблевой области гемагглютинина вируса гриппа. Настоящее изобретение, в частности, относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям, описанным выше, для применения в качестве вакцины для профилактики и/или лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом гриппа А филогенетической группы 1 и/или филогенетической группы 2 и/или вирусом гриппа В. В одном варианте осуществления вакцину можно использовать для профилактики и/или лечения заболеваний, вызванных двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более различными подтипами филогенетической группы 1 и/или 2 и/или вирусами гриппа В. Полипептиды по настоящему изобретению можно применять после синтеза *in vitro* или в приемлемой клеточной системе экспрессии, включая бактериальные и эукариотические клетки, или в качестве альтернативы можно экспрессировать *in vivo* в пациенте, нуждающемся в этом, путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуногенный полипептид. Такие вакцины нуклеиновых кислот могут принимать любую форму, в том числе голой ДНК, плазмид или вирусных векторов, включая аденовирусные векторы.

Введение полипептидов, молекул нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению можно

выполнить с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие примеры включают в себя парентеральное введение, такое как внутривенное, внутрикожное, чрескожное, внутримышечное, подкожное и т.д., или введение через слизистую оболочку, например, интраназальное, пероральное и т.п. Специалист в данной области будет способен определить различные возможности для введения полипептидов, молекул нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению с целью индуцирования иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию (или вакцину) вводят более чем один раз, т.е. в так называемом режиме гомологичного прайм-буста. В некоторых вариантах осуществления, где полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию вводят более чем один раз, введение второй дозы можно выполнить через промежуток времени, например, одну неделю или более после введения первой дозы, две недели или более после введения первой дозы, три недели или более после введения первой дозы, один месяц или более после введения первой дозы, шесть недель или более после введения первой дозы, два месяца или более после введения первой дозы, 3 месяца или более после введения первой дозы, 4 месяца или более после введения первой дозы и т.д., вплоть до нескольких лет после введения первой дозы полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции. Кроме того, можно вводить вакцину более двух раз, например три раза, четыре раза и т.д., так что за первым приммирующим введением следует более чем одно реиммунизирующее введение. В других вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят только один раз.

Полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или иммуногенные композиции можно также вводить либо как начальную дозу, либо как повторную дозу в режиме гетерологичного прайм-буста.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы профилактики и/или лечения заболевания вирусом гриппа у пациента с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или

композиций, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления способ профилактики и/или лечения заболевания вирусом гриппа у пациента включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептида, нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции, как описано выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, нуклеиновой кислоты и/или композиции, как определено в настоящем документе, которое является эффективным для профилактики, ослабления и/или лечения заболевания или состояния, являющегося результатом инфицирования вирусом гриппа А группы 1 или 2 и/или вирусом гриппа В. Профилактика охватывает ингибирование или снижение распространения вируса гриппа или ингибирование или снижение начала, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, связанных с инфицированием вирусом гриппа. Применяемое в настоящем документе ослабление может относиться к уменьшению видимых или ощутимых симптомов заболевания, вирусемии или других поддающихся измерению проявлений инфицирования гриппом.

Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже подвержен состоянию, являющемуся результатом инфицирования вирусом гриппа А группы 1 или группы 2, или вирусом гриппа В, а также тех, у кого инфицирование вирусом гриппа должно быть предотвращено. Полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или композиции по настоящему изобретению, таким образом, можно ввести "наивному" пациенту, т.е. пациенту, который не страдает заболеванием, вызванным инфекцией вируса гриппа, или не был и в настоящее время не инфицирован вирусом гриппа, или пациентам, которые уже являются и/или были инфицированы вирусом гриппа.

В одном варианте осуществления профилактика и/или лечение могут быть направлены на группы пациентов, которые восприимчивы к инфекции вируса гриппа. Такие группы пациентов включают без ограничений, например, пожилых (например, ≥ 50 лет, ≥ 60 лет и предпочтительно ≥ 65 лет), молодых (например, ≤ 5 лет, ≤ 1 года), госпитализированных пациентов и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но проявили недостаточный

противовирусный ответ.

В другом варианте осуществления полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или иммуногенные композиции можно вводить пациенту в комбинации с одним или несколькими другими активными средствами, такими как существующие или будущие противогриппозные вакцины, моноклональные антитела и/или противовирусные средства и/или антибактериальные и/или иммуномодулирующие средства. Одно или несколько других активных средств может быть полезным в лечении и/или профилактике заболевания вирусом гриппа или может ослабить симптом или состояние, связанное с заболеванием вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других активных средств представляют собой обезболивающие, жаропонижающие препараты или методы лечения, которые облегчают или оказывают помощь при дыхании.

Режимы дозировки полипептидов и/или молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно скорректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Приемлемый диапазон дозировок может, например, составлять 0,1-100 мг/кг массы тела, предпочтительно 1-50 мг/кг массы тела, предпочтительно 0,5-15 мг/кг массы тела. Точная дозировка полипептидов и/или молекул нуклеиновой кислоты, которые должны быть использованы, будет, например, зависеть от пути введения и серьезности инфекции или заболевания, вызванного ей, и должна быть выбрана в соответствии с решением врача и состоянием каждого пациента. Например, эффективные дозы варьируют в зависимости от целевого сайта, физиологического состояния пациента (в том числе возраста, массы тела, здоровья) и того, является ли обработка профилактической или терапевтической. Как правило, пациентом является человек, млекопитающие, кроме человека, в том числе трансгенные млекопитающие, также могут подвергаться лечению. Лечебные дозировки оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

Полипептиды по настоящему изобретению также можно использовать для проверки связывания моноклональных антител, выявленных в качестве потенциальных терапевтических кандидатов.

Кроме того, полипептиды по настоящему изобретению можно использовать в качестве диагностического средства, например, для проверки иммунного статуса индивидуума путем определения способности антител в сыворотке такого индивида к связыванию с полипептидом по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу диагностики *in vitro* для обнаружения присутствия инфекции вируса гриппа у пациента, при этом указанный способ включает следующие этапы: а) контактирование биологического образца, полученного из указанного пациента, с полипептидом согласно настоящему изобретению и б) обнаружение присутствия комплексов антиген-антитело.

Полипептиды по настоящему изобретению также можно использовать для идентификации новых связывающих молекул или улучшения существующих связывающих молекул, таких как моноклональные антитела и противовирусные средства.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и фигурами. Примеры не предусмотрены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Подготовка новых стеблевых полипептидов

В PCT/EP2012/073706 раскрыты полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, композиции и вакцины, а также способы их применения в области профилактики и/или лечения гриппа. В настоящем документе мы описываем дополнительные последовательности полипептидов стеблевого домена, полученные из полноразмерного НА из H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Новые полипептиды стеблевого домена получают путем сайт-направленной мутации в H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) и представляют нейтрализующий эпитоп гриппа широкого спектра для CR6261 (Throsby et al., 2009; Ekiert et al. 2010) и/или CR9114.

H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) получен из полноразмерного НА из H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1) посредством следующих этапов:

1. Удаление сайта расщепления в HA0. Расщепление HA дикого типа в данном сайте приводит к образованию HA1 и HA2. Удаления

можно достичь посредством мутации R на Q в положении P1 (см., например, Sun et al., 2010 для объяснения номенклатуры сайта расщепления (положение 343 в SEQ ID NO: 1).

2. Удаление головного домена путем делеции аминокислот с 53 по 320 в SEQ ID NO: 1. Оставшиеся N- и C-концевые части последовательности соединяли с помощью гибкого линкера из четырех остатков, GGGG.

3. Повышение растворимости петли (между A-спиралью и спиралью CD), образованной с помощью (эквивалентных) остатков с 402 по 418 в H1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1) для того, чтобы одновременно повысить стабильность предгибридизационной конформации и дестабилизировать постгибридизационную конформацию модифицированного HA. В H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) мутации F406S, V409T, F413G и L416S (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) вводили.

4. Введение дисульфидного мостика между аминокислотами в положении 324 и 436 в H1 A/Brisbane/59/2007; этого достигают посредством введения мутаций R324C и Y436C. (нумерация относится к SEQ ID NO: 1)

5. Введение полученной из GCN4 последовательности MKQIEDKIEEIESKQ (SEQ ID NO: 5), которая известна, как тримеризующая, в положение 419-433 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления последовательность трансмембранного и внутриклеточного домена была удалена от положения (или эквивалентного ему, как определено по выравниванию последовательности) 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 526, 527, 528, 529 или 530 из HA2 до C-конца HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), так что секретируемый (растворимый) полипептид получают после экспрессии в клетках. Растворимый полипептид можно дополнительно стабилизировать путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. последовательность-фолдон AYVRKDGEWVLL (SEQ ID

NO: 3), факультативно присоединенную посредством короткого линкера, как описано выше. Линкер может факультативно содержать сайт расщепления для последующей обработки согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Для облегчения очистки и обнаружения растворимой формы можно необязательно добавлять последовательность метки, например, гистидиновой метки (НННННН (SEQ ID NO: 20) или НННННН (SEQ ID NO: 21)) или FLAG-метки (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 22) или их комбинации, необязательно присоединенной посредством коротких линкеров. Линкер может факультативно содержать сайт (часть сайта) протеолитического расщепления, например, LVPRGS (SEQ ID NO: 23) (тромбин) или IEGR (SEQ ID NO: 24) (фактор X) для последующей обработки согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Обработанные белки также охвачены в настоящем изобретении.

Примером такой С-концевой последовательности, объединяющей FLAG-метку, сайт расщепления тромбина, фолдон и последовательность His, является SEQ ID NO: 4 FLAG-тромбин-фолдон-His. Эту последовательность объединяли с растворимой формой H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) последовательности для создания исходной последовательности (SEQ ID NO: 6), которую использовали для создания новых полипептидов по настоящему изобретению путем мутагенеза. Эта последовательность не содержит лидерную последовательность, соответствующую аминокислотам 1-17 в SEQ ID NO: 1 и 2.

Полипептиды стеблевого домена создают посредством делеции части последовательности гемагглютинаина, которая кодирует головной домен молекулы, и повторного соединения N- и С-концевых частей последовательности по обе стороны от делеции посредством линкера, как описано в PCT/2012/073706 и выше. Удаление головного домена оставляет часть молекулы, которая была ранее защищена от водного растворителя, открытой, потенциально дестабилизируя структуру полипептидов по настоящему изобретению. По этой причине остатки в В-петле (в частности, аминокислотный остаток 406 (F и S в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно), 409 (V и T), 413 (F и G) и 416 (L и S) мутировали в различных комбинациях

с использованием исходной последовательности SEQ ID NO: 6 в качестве исходной точки. SEQ ID NO: 6 создавали из H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) путем удаления лидерной последовательности и замещения остатков 520-565 последовательностью Flag-тромбин-фолдон-his (SEQ ID NO: 4).

Аналогичным образом, в области вокруг гибридного пептида ряд гидрофобных остатков открывают для растворителя, что обусловлено тем фактом, что в отличие от нативного полноразмерного НА полипептиды по настоящему изобретению не могут быть расщеплены и проходят ассоциированное конформационное изменение, которое погружает гидрофобный гибридный пептид во внутреннюю часть белка. Чтобы решить эту проблему, некоторые или все из остатков I337, I340, F352 и I353 в SEQ ID NO: 2 также мутировали.

Спираль А из НА представляет собой важную часть эпитопов в нейтрализующих эпитопах широкого спектра для CR6261, CR9114 и FI6.v3. Аминокислотный остаток M402 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) находится на С-конце этой спирали и для дополнительной стабилизации спиральной структуры этот остаток также стал мишенью при создании новых полипептидов по настоящему изобретению. Два различных набора мутантных полипептидов раскрыты в Таблице 1.

Таблица 1

Мутации, созданные в SEQ ID NO: 6. Соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 1 (полноразмерный, wt НА) и SEQ ID NO: 6 также указаны.

Набор 1

Положение	остаток		введенные аминокислоты
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 6	
337	I	I	E, I, K, V
340	I	I	I, K, R, T
352	F	F	D, F, V, Y
353	I	I	I, K, R, T
402	M	M	E, K, M, V
406	F	S	F, I, N, T, Y, S

409	V	T	A, G, I, R, T, V
413	F	G	F, I, N, S, T, Y, G
416	L	S	H, I, L, N, R, S

Набор 2

Положение	остаток		введенные аминокислоты
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 6	
337	I	I	A, E, I, K, T, V
340	I	I	F, I, N, S, T, Y
352	F	F	A, D, F, I, N, S, T, V, Y
353	I	I	E, G, I, K, R, V
402	M	M	M, R, T
406	F	S	F, H, L, Y,
409	V	T	F, I, S, T
413	F	G	E, K, M, V
416	L	S	I, L, R, S

Пример 2. Обнаружение экспрессии и связывания полипептида с нейтрализующими антителами широкого спектра

Последовательности ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, трансформировали в *Pichia pastoris* или трансфицировали в клетки HEK293F с использованием протоколов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Конструкции, использованные для экспрессии в клетках млекопитающих, содержали лидерную последовательность НА (остатки 1-17 в SEQ ID NO: 1 и 2), тогда как в конструкциях, использованных для экспрессии в *P. pastoris*, лидерную последовательность НА заменяли лидерной последовательностью альфа-фактора дрожжей (SEQ ID NO: 7). Таким способом экспрессированный белок направляют в среду для культивирования клеток, позволяя определить связывание и экспрессию без дополнительной очистки полипептидов по настоящему изобретению. Все последовательности содержали С-концевую последовательность FLAG-фолдон-HIS (SEQ ID NO: 4).

Связывание моноклональных антител (CR6261, CR9114, CR8020) с

полипептидами по настоящему изобретению определяли с помощью ELISA. Для этого планшеты для ELISA обрабатывали в течение ночи 2 мкг/мл раствора моноклонального антитела (20 мкл/лунку) при 4°C. После удаления раствора антитела оставшуюся поверхность блокировали 4% раствором порошка обезжиренного сухого молока в PBS в течение минимум 1 ч при комнатной температуре. После промывки планшетов 20 мкл среды для культивирования клеток (чистой или разбавленной) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты для ELISA промывали и добавляли 20 мкл раствора антитела против FLAG-HRP (Sigma A8952, разбавленное в 2000 раз в 4% обезжиренном сухом молоке в PBS-Tween). После инкубации (1 ч при комнатной температуре) планшеты еще раз промывали и добавляли 20 мкл люминесцентного субстрата (Thermoscientific C#34078) для обнаружения сигнала. В качестве альтернативы колориметрический способ регистрации можно применять для обнаружения сигнала.

Экспрессию полипептидов по настоящему изобретению определяли в анализе гомогенной флуоресценции с временным разрешением (для общего описания см., например, Degorce et al., Curr. Chem. Genomics 2009 3: 22-32). Для этого смесь меченого тербием (Tb) моноклонального антитела против FLAG (донор) и меченого Alexa488 моноклонального антитела против His (акцептор) (раствор HTRF) готовили путем добавления 210,5 мкл антитела против FLAG-Tb (исходный раствор 26 мкг/мл) и 1,68 мл антитела против HIS-488 (исходный раствор 50 мкг/мл) к 80 мл смеси 1 к 1 культуральной среды и 50 мМ HEPES + 0,1% BSA. 19 мкл раствора HTRF добавляли в каждую лунку планшета для ELISA и добавляли 1 мкл культуральной среды. При возбуждении и после задержки, чтобы обеспечить распад мешающих короткоживущих фоновых сигналов, возникающих из других соединений (белков, компонентов среды и т.д.), определяли отношение флуоресцентного излучения при 520 и 665 нм. Это является мерой общего содержания белка в образце и используется для нормализации сигналов связывания mAb между различными экспериментами.

Полипептиды по настоящему изобретению, перечисленные в

Таблице 4 и 5, экспрессировали в P.Pastoris, следуя протоколам, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Культуральную среду собирали и связывание с CR6261, связывание и экспрессию полипептидов стеблевого домена определяли, как описано выше. Поскольку ответ в анализе связывания сопоставим с концентрацией экспрессированного белка, сигнал связывания в ELISA нормализовали для экспрессии белка путем сравнения отношения сигнала связывания к сигналу в анализе HTRF для каждой экспрессированной последовательности. Все экспрессированные белки демонстрируют более высокое отношение связывания CR626 к сигналу HTRF по сравнению с исходной последовательностью SEQ ID NO: 6.

Полипептиды по настоящему изобретению, перечисленные в Таблице 6, экспрессировали в клетках HEK293F, следуя протоколам, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Культуральную среду собирали и связывание с CR6261, связывание и экспрессию полипептидов стеблевого домена определяли, как описано выше. Отношение связывания CR6261 к сигналам HTRF рассчитывали и сравнивали с отношением, рассчитанным для исходной последовательности SEQ ID NO: 6. Результаты перечислены в Таблице 6; все экспрессированные белки демонстрируют более высокое отношение, указывая, что стеблевые полипептиды по настоящему изобретению показывают повышенное связывание CR6261.

Пример 3: *Очистка и определение параметров полипептидов по настоящему изобретению*

Для дополнительного описания полипептидов по настоящему изобретению иммуногены 127H1 (SEQ ID NO: 55), 86B4 (SEQ ID NO: 56), 74H9 (SEQ ID NO: 57), 6E12 (SEQ ID NO: 58) и 55G7 (SEQ ID NO: 59) культивировали и очищали до гомогенности. Для того, чтобы получить высоко очищенный препарат полипептида по настоящему изобретению клетки HEK293F трансфицировали вектором экспрессии pсDNA2004, содержащим гены, кодирующие растворимые формы 127H1 (SEQ ID NO: 55), 86B4 (SEQ ID NO: 56), 74H9 (SEQ ID NO: 57), 6E12 (SEQ ID NO: 58) и 55G7 (SEQ ID NO: 59). Растворимые формы создавали в данном случае путем замены остатка 519-565 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) последовательностью

RSLVPRGSPGNHHHHH (SEQ ID NO: 69). Специалисту в данной области техники будет понятно, что лидерная последовательность (или сигнальная последовательность), которая направляет транспорт белка в ходе производства (соответствующая аминокислотам 1-17 из SEQ ID NO: 1), не будет присутствовать в секретируемом конечном полипептиде. Аминокислотные последовательности растворимых секретируемых белков даны в виде SEQ ID NO: 65 до 69.

Для получения полипептидов по настоящему изобретению $1,0 \times 10^6$ клеток/мл высевали путем осаждения клеток HEK293F (Invitrogen) при 300 g в течение 5 мин и ресуспендирования в 300 мл подогретой среды Freestyle™ на колбу SF1000. Эту культуру инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 10% CO₂ при 110 об/мин в инкубаторе Multitron. Через 1 час плазмидную ДНК пипетировали в 9,9 мл среды Optimem до концентрации 1,0 мкг/мл в 300 мл культурального объема. Параллельно 440 мкл 293fectin® пипетировали в 9,9 мл среды Optimem и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Через 5 минут смесь плазмидной ДНК/Optimem добавляли к смеси 293fectin®/Optimem и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. После инкубации смесь плазмидной ДНК/293fectin® добавляли по каплям к клеточной суспензии. Трансфицированную культуру инкубировали при 37°C, 10% CO₂ и 110 об/мин в инкубаторе Multitron. На 7-й день клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием (30 мин при 3000 g), в то время как супернатант, содержащий растворимые полипептиды по настоящему изобретению, фильтровали через бутылочный фильтр 0,2 мкм для дополнительной обработки.

Для очистки приблизительно 1400 мл супернатанта культуры клеток, трансфицированных генами, кодирующими растворимые формы (как описано выше) полипептидов по настоящему изобретению 127H1 (SEQ ID NO: 55), 86B4 (SEQ ID NO: 56), 74H9 (SEQ ID NO: 57), 6E12 (SEQ ID NO: 58) или 55G7 (SEQ ID NO: 59), наносили на колонку 24 мл Ni Sepharose HP, предварительно уравновешенную в промывочном буфере (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7,8). После этапа промывки с 10 mM Imidaze в промывочном буфере связанные

полипептиды по настоящему изобретению элюировали ступенчатым градиентом 300 мМ имидазола в промывочном буфере. Пики элюента собирали, буфер меняли, концентрировали и наносили на эксклюзионную колонку для дополнительной очистки (Superdex 200). Фракции собирали во время элюирования и анализировали на содержание белка с помощью SDS-PAGE и вестерн-блота (с использованием моноклонального антитела, специфичного для гистидиновых меток). Фракции, содержащие очищенные полипептиды по настоящему изобретению, собирали и использовали для дополнительного анализа. Чистоту определяли с помощью эксклюзионной хроматографии и она составляла более 90% во всех случаях. Характеристики процедур очистки перечислены в Таблице 8.

Для анализа реакции связывания между полипептидами по настоящему изобретению и для подтверждения присутствия конформационных эпитопов для CR6261 и CR9114 исследовали комплексообразование этих антител с очищенным белком с использованием интерферометрии в биослое (Octet Red³⁸⁴, Forte Bio). Для этого биотинилированные CR6261, CR9114 иммобилизовали на покрытых стрептавидином сенсорах, на которые впоследствии воздействовали сначала раствором очищенного полипептида по настоящему изобретению для измерения скорости ассоциации, а затем промывочным раствором для измерения скорости диссоциации. Оба иммобилизованных CR6261 и CR9114 распознают полипептиды по настоящему изобретению, как свидетельствуют четкие ответы после воздействия растворимой формы полипептидов по настоящему изобретению. Чтобы оценить константу диссоциации для взаимодействия связывания проводили титрование с использованием серий 2-кратного разведения. На сенсоры, содержащие иммобилизованное CR6261, воздействовали растворами, содержащими растворимые полипептиды по настоящему изобретению в концентрациях 750, 375, 163, 81, 40, 20 и 10 нМ, соответственно, кроме случая с очищенным s55G7 (SEQ ID NO: 68), где использовали диапазон концентраций 2000, 1000, 500, 250, 125, 63 и 31 нМ. Аналогичным образом, на сенсоры, содержащие иммобилизованное CR9114, воздействовали растворами, содержащими растворимые

полипептиды по настоящему изобретению, в концентрациях 300, 150, 75, 38, 19, 9 и 5 нМ, соответственно. Во всех случаях записывали конечный ответ через 4000 секунд, строили график зависимости от концентрации полипептида и выполняли аппроксимацию к модели связывания 1:1 в равновесном состоянии для расчета кажущейся константы диссоциации K_d (см. Фигуру 2А-Е). Значения, определенные таким образом, перечислены в Таблице 8.

Связывание между полипептидами по настоящему изобретению s127H1 (SEQ ID NO: 66), s86B4 (SEQ ID NO: 67), s74H9 (SEQ ID NO: 65), s6E12 (SEQ ID NO: 69) и s55G7 (SEQ ID NO: 68) и Fab-фрагментами CR6261, CR9114 и, в качестве контроля, CR8020 исследовали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоракурсным светорассеянием (SEC-MALS). Эта технология позволяет одновременно разделять и оценивать размер молекул для различных химических соединений и/или комплексов. Результаты показаны в Фигуре 3А-Е и суммированы в Таблице 9. Данные указывают, что полипептиды по настоящему изобретению являются мономерными и образуют комплекс 1:1 с Fab-фрагментами CR6261 и CR9114, но не CR8020. Это согласуется со специфичностью реакций связывания Fab-фрагментов, поскольку CR6261 и CR9114 связываются с НА, полученными из группы 1, тогда как CR8020 - нет.

В заключение, мы показали, что растворимые формы полипептидов по настоящему изобретению 127H1 (SEQ ID NO: 55), 86B4 (SEQ ID NO: 56), 74H9 (SEQ ID NO: 57), 6E12 (SEQ ID NO: 581) и 55G7 (SEQ ID NO: 59) можно получить и очистить до гомогенности. Очищенные растворимые полипептиды по настоящему изобретению способны связывать нейтрализующие моноклональные антитела широкого спектра CR6261 и CR9114 с высокой аффинностью, подтверждая наличие соответствующих нейтрализующих эпитопов в этих полипептидах стеблевого домена.

Пример 4: *Оценка профилактической эффективности полипептидов по настоящему изобретению на модели летального контрольного заражения гриппом*

Для того, чтобы оценить профилактическую эффективность полипептидов по настоящему изобретению на модели летального

контрольного заражения гриппом, группы из 10 самок мышей BALB/c (возрастом 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с 3-недельными интервалами с 30 мкг очищенного s86B4 (SEQ ID NO: 67) и s74H9 (SEQ ID NO: 65), усиленного 10 мкг Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения i.m. вводили CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения, тогда как иммунизация с PBS служила в качестве отрицательного контроля. Через четыре недели после последней иммунизации мышам проводили контрольное заражение с 25xLD50 гетерологичного вируса контрольного заражения (H1N1 A/NL/602/09) и ежедневно контролировали (выживаемость, вес, клинические баллы) в течение 3 недель. Сыворотку крови до контрольного заражения проверяют в анализах ELISA на связывание с полипептидом по настоящему изобретению, использованным для иммунизации (для проверки правильности иммунизации), на связывание с растворимым полноразмерным НА из H1N1 A/Brisbane/59/07 и на конкуренцию за связывание с полноразмерным НА с нейтрализующим антителом широкого спектра - моноклональным антителом CR9114 (для определения того, связываются ли индуцированные антитела рядом с нейтрализующим эпитопом широкого спектра для CR9114). Результаты показаны в Фигуре 4А и В.

Результаты показывают, что эксперимент обоснован, поскольку все мыши в контрольной группе с PBS погибали от инфекции в или до 8-го дня после контрольного заражения, тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена. В отличие от мышей, обработанных PBS, 4 из 10 мышей, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению s86B4 (SEQ ID NO: 67) или s74H9 (SEQ ID NO: 65), выжили после летального контрольного заражения. Это приводит к увеличенному времени выживаемости и сниженному клиническому показателю для групп, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению, по сравнению с контрольной группой с PBS.

Данные ELISA (см. Фигуру 4В) с использованием когнатного антигена (т.е. либо s86B4, либо s74H9) или полноразмерного НА в качестве антигена указывают, что оба полипептида по настоящему

изобретению, s74H9 и s86B4, являются иммуногенными и индуцируют антитела, которые способны распознавать полноразмерный HA.

Для дальнейшего понимания иммунологического ответа на иммунизацию выполнили ELISA с конкурентным связыванием. С этой целью планшет, связывающий полноразмерный HA, инкубируют с образцами сыворотки крови в серийном разведении, после чего добавляют CR9114-биотин в заранее определенной концентрации. После дополнительной инкубации оценивают количество связанного CR9114-биотина. Данные анализируют с использованием линейной регрессии OD против log разведения, выраженного как 'наклон OD' ($\Delta OD/10$ -кратное разведение). Данные показывают, что антитела, которые способны конкурировать за связывание с нейтрализующим антителом широкого спектра CR9114, индуцируют путем иммунизации полипептидами по настоящему изобретению. Для сравнения уровни конкуренции с немеченым CR9114 (т.е. самоконкуренция) и несвязывающим моноклональным антителом CR8020, оба в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл, показаны на отдельном графике.

В заключение, эти данные показывают, что иммунизация полипептидами по настоящему изобретению s86B4 (SEQ ID NO: 67) или s74H9 (SEQ ID NO: может защищать мышей от летального инфицирования вирусом гриппа. Оба полипептида являются иммуногенными, индуцируют антитела, которые могут связываться с полноразмерным HA, и по меньшей мере часть этих антител связывается на или поблизости от нейтрализующего эпитопа широкого спектра для моноклонального антитела CR9114.

Пример 5: Оценка профилактической эффективности другого полипептида по настоящему изобретению на модели летального контрольного заражения гриппом

Для того, чтобы оценить профилактическую эффективность другого полипептида по настоящему изобретению s127H1 (SEQ ID NO: 66) на модели летального контрольного заражения гриппом группы из 10 самок мышей BALB/c (возрастом 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с 3-недельными интервалами 30 мкг очищенного s127H1, усиленного 10 мкг Matrix-M. В качестве положительного контроля

для модели контрольного заражения i.m. вводили нейтрализующее антитело широкого спектра - моноклональное антитело CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения, тогда как иммунизация с PBS служила в качестве отрицательного контроля. Через четыре недели после последней иммунизации мышам проводили контрольное заражение с 25xLD50 гетерологичного вируса контрольного заражения (H1N1 A/Puerto Rico/8/34) и ежедневно контролировали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель. Сыворотку крови до контрольного заражения проверяют в анализах ELISA на связывание с полипептидом по настоящему изобретению s127H1, который использовали для иммунизации (для проверки правильности иммунизации), на связывание с растворимым полноразмерным НА из H1N1 A/Brisbane/59/07 и на конкуренцию за связывание с полноразмерным НА с нейтрализующим антителом широкого спектра - моноклональным антителом CR9114 (для определения того, связываются ли индуцированные антитела рядом с нейтрализующим эпитопом широкого спектра для CR9114). Результаты показаны в Фигуре 5А и В.

Результаты показывают, что эксперимент обоснован, поскольку все мыши в контрольной группе с PBS погибали от инфекции на 7-й день после контрольного заражения, тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена. В отличие от мышей, обработанных PBS, 7 из 10 мышей, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению s127H1 (SEQ ID NO: 66), выжили после летального контрольного заражения. Это привело к увеличенной пропорции выживаемости, увеличенному времени выживаемости и снижению клиническому показателю для групп, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению s127H1, по сравнению с контрольной группой с PBS.

Данные ELISA с использованием s127H1 или растворимого полноразмерного НА в качестве антигена указывают, что полипептид по настоящему изобретению s127H1 является иммуногенным и индуцирует антитела, которые способны распознавать полноразмерный НА (см. Фигуру 5В). Для дальнейшего понимания иммунологического ответа на иммунизацию выполняли ELISA с

конкурентным связыванием. С этой целью планшет, связывающий полноразмерный НА, инкубируют с образцами сыворотки крови в серийном разведении, после чего добавляют CR9114-биотин в заранее определенной титрованной концентрации. После дополнительной инкубации оценивают количество связанного CR9114-биотина с использованием конъюгированной со стрептавидином пероксидазы хрена согласно протоколам, хорошо известным в уровне техники. Данные анализируют с использованием линейной регрессии OD против log разведения, выраженного как 'наклон OD' ($\Delta OD/10$ -кратное разведение). Данные показывают, что антитела, которые способны конкурировать за связывание с нейтрализующим антителом широкого спектра CR9114, индуцируют путем иммунизации полипептидами по настоящему изобретению, на что указывают повышенные уровни конкуренции, наблюдаемые в Фигуре 5B. Для сравнения уровни конкуренции с немеченым CR9114 (т.е. самоконкуренция) и несвязывающим моноклональным антителом CR8020, оба в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл, показаны на отдельном графике.

В заключение, мы показали, что иммунизация полипептидом по настоящему изобретению s127H1 (SEQ ID NO: 66) может защищать мышей от летального инфицирования гриппом. Полипептид является иммуногенным, индуцирует антитела, которые могут связываться с полноразмерным НА, и по меньшей мере часть этих антител связывается на или поблизости от нейтрализующего эпитопа широкого спектра для моноклонального антитела CR9114.

Пример 6: Анализ улучшенных связывающих веществ для CR6261 из набора 1 и набора 2.

Для дальнейшего понимания того, какие последовательности могут приводить к повышенному связыванию CR6261 по сравнению с исходной последовательностью SEQ ID NO: 6, последовательности, перечисленные в Таблице 4 и 5, анализировали дополнительно. С этой целью для каждого намеченного положения рассчитывали относительную частоту каждой из переменных аминокислот, присутствующих в наборе улучшенных связывающих веществ, и сравнивали с ожидаемой частотой, если не было никакого предпочтения для любой из переменных аминокислот (см. Фигуру 6

и 8 для последовательностей из набора 1 и 2, соответственно). Данные показывают, что некоторые аминокислоты более распространены в определенных положениях в последовательностях, которые показывают улучшенное связывание CR6261.

Как в наборе 1, так и 2, наблюдают высокую распространенность для Met в положении 402 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) в последовательностях с улучшенным связыванием, хотя в наборе 1 также наблюдают Val в некоторых случаях. Аналогичным образом, в положении 352 высокую распространенность ароматических аминокислот Phe и Tyr, в положении 416 повышенную распространенность Ser (хотя и не очень стабильно в наборе 1) и для положения 337 повышенную распространенность Lys наблюдают в обоих наборах. Следует отметить, что Ser в положении 416 вводит предполагаемый сайт N-гликозилирования в Asn414. Кроме того, в положении 340 Asn высоко распространен в улучшенных связывающих веществах для CR6261 в наборе 2, в то время как в наборе 1 Thr является более распространенным; обе мутации вводят предполагаемый сайт гликозилирования в положении 340: Asn приводит к появлению предполагаемого сайта N-гликозилирования, тогда как Thr приводит к появлению предполагаемого сайта O-гликозилирования. В положении 353 Thr высоко распространен в улучшенных связывающих веществах из набора 1, в то время как в улучшенных связывающих веществах из набора 2 самой распространенной аминокислотой является Val. В положениях 406 и 409 наиболее распространенными аминокислотами в улучшенных связывающих веществах для CR6261 являются гидрофобные: в положении 406 наиболее распространенными являются Ile и Phe (набор 1), а также Phe и Leu (набор 2), в положении 409 наиболее распространенными являются Ile и Val (набор 1), а также Phe и Ile (набор 2). Наконец, в положении 413 Phe является наиболее распространенной аминокислотой среди улучшенных связывающих веществ для CR6261 из набора 1, в то время как Glu является наиболее распространенным среди улучшенных связывающих веществ из набора 2.

Последовательности улучшенных связывающих веществ для CR6261 дополнительно анализировали с тем, чтобы определить, были ли

некоторые комбинации аминокислот более распространены среди улучшенных связывающих веществ для CR6261, чем другие. С этой целью ряд улучшенных связывающих последовательностей, содержащих определенную комбинацию аминокислот, обсчитывали и строили на графике, как показано на Фигуре 7А, В (улучшенные связывающие вещества из набора 1) и Фигуре 9А, В (набор 2). Данные организовывали в соответствии с различными областями, рассмотренными в мутантных наборах полипептидов, т.е. область гибридного пептида (остаток номер 337, 340, 352 и 353; Фигура 7А и 9А для улучшенных связывающих веществ из набора 1 и 2, соответственно) и В-петля (остаток номер 406, 409, 413 и 416; Фигура 7В и 9В). В связи с очень высокой распространенностью Met в положении 402, это положение не включали в анализ для выявления часто встречающихся комбинаций, так как почти все комбинации других положений с положением 402 содержат Met.

Среди улучшенных связывающих веществ для CR6261 из набора 1 комбинации либо Phe, либо Tyr в положении 352 либо с Ile, либо с Thr в положении 353 являются наиболее распространенными (области в рамке на Фигуре 7А). В отношении комбинаций аминокислот в области В-петли Ile в положении 406 в сочетании либо с Phe, либо с Tyr (т.е. ароматическая аминокислота) в положении 413 и Tyr в положении 406 в сочетании с N в положении 413 показывают увеличенную распространенность среди улучшенных связывающих веществ для CR6261 (области в рамке на Фигуре 7В).

Для анализа последовательностей улучшенных связывающих веществ для CR6261 среди полипептидов из набора 2 с акцентом на области гибридного пептида только последовательности, содержащие либо Phe, либо Tyr в положении 352, принимали во внимание. Наибольшее распространение среди улучшенных связывающих веществ для CR6261 с Phe или Tyr в положении 352 имеют последовательности с Asn в положении 340 (см. область в рамке на Фигуре 9А). Для области В-петли последовательности с Phe, Leu или Tyr в положении 406 в комбинации с Glu, Met или Val в положении 413 (области в рамке на Фигуре 9В) являются наиболее распространенными среди улучшенных связывающих веществ для CR6261.

В заключение, анализ показывает, что в области гибридного пептида введение Thr в положении 353, в частности, в комбинации с ароматическим остатком (Phe или Tyr) в положении 352, может улучшать связывание CR6261 с растворимыми полипептидами по настоящему изобретению. Кроме того, Lys в положении 337 или введение предполагаемого сайта N-гликозилирования путем введения Asn в положении 340 также может вносить вклад в улучшение связывания CR6261. В области В-петли большой гидрофобный остаток (Phe, Tyr, Leu или Ile) может способствовать улучшению связывания с CR6261. В частности, Phe, Leu или Tyr в положении 406 в комбинации с Glu, Met или Val в положении 413 может улучшать связывание с CR6261. Полипептиды по настоящему изобретению, содержащие эти остатки в описанных положениях, представляют собой предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения.

Таблица 2

Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3- буквенная	1- буквенная	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (рН 7,4)
Аланин	Ala	A	Неполярная	Нейтральный
Аргинин	Arg	R	Полярная	Положительный
Аспарагин	Asn	N	Полярная	Нейтральный
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Полярная	Отрицательный
Цистеин	Cys	C	Неполярная	Нейтральный
Глутаминовая кислота	Glu	E	Полярная	Отрицательный
Глутамин	Gln	Q	Полярная	Нейтральный
Глицин	Gly	G	Неполярная	Нейтральный
Гистидин	His	H	Полярная	Положительная (10%) нейтральная (90%)
Изолейцин	Ile	I	Неполярная	Нейтральный

Лейцин	Leu	L	Неполярная	Нейтральный
Лизин	Lys	K	Полярная	Положительный
Метионин	Met	M	Неполярная	Нейтральный
Фенилаланин	Phe	F	Неполярная	Нейтральный
Пролин	Pro	P	Неполярная	Нейтральный
Серин	Ser	S	Полярная	Нейтральный
Треонин	Thr	T	Полярная	Нейтральный
Триптофан	Trp	W	Неполярная	Нейтральный
Тирозин	Tyr	Y	Полярная	Нейтральный
Валин	Val	V	Неполярная	Нейтральный

Таблица 3

Выравнивание последовательности для последовательностей H1
согласно специфическим вариантам осуществления настоящего
изобретения

1. A/Solomon Islands/6/2003 (H1N1) (SEQ ID NO: 25)
2. A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 1)
3. A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) (SEQ ID NO: 26)
4. A/California/07/2009 (H1N1) (SEQ ID NO: 27)
5. A/swine/Hubei/S1/2009 (H1N1) (SEQ ID NO: 28)
6. A/swine/Haseluenne/IDT2617/2003 (H1N1) (SEQ ID NO: 29)
7. A/NewYork/8/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 30)
8. A/SolomonIslands/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 31)
9. A/NewYork/146/2000 (H1N1) (SEQ ID NO: 32)
10. A/NewYork/653/1996 (H1N1) (SEQ ID NO: 33)
11. A/Beijing/262/1995 (H1N1) (SEQ ID NO: 34)
12. A/Texas/36/1991 (H1N1) (SEQ ID NO: 35)
13. A/Singapore/6/1986 (H1N1) (SEQ ID NO: 36)
14. A/Chile/1/1983 (H1N1) (SEQ ID NO: 37)
15. A/Baylor/11515/1982 (H1N1) (SEQ ID NO: 38)
16. A/Brazil/11/1978 (H1N1) (SEQ ID NO: 39)
17. A/USSR/90/1977 (H1N1) (SEQ ID NO: 40)
18. A/NewJersey/8/1976 (H1N1) (SEQ ID NO: 41)
19. A/Denver/1957 (H1N1) (SEQ ID NO: 42)
20. A/Albany/4835/1948 (H1N1) (SEQ ID NO: 43)
21. A/FortMonmouth/1/1947 (H1N1) (SEQ ID NO: 44)

22. A/Cameron/1946 (H1N1) (SEQ ID NO: 45)
23. A/Weiss/1943 (H1N1) (SEQ ID NO: 46)
24. A/Iowa/1943 (H1N1) (SEQ ID NO: 47)
25. A/Bellamy/1942 (H1N1) (SEQ ID NO: 48)
26. A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) (SEQ ID NO: 49)
27. A/WSN/1933 (H1N1) (SEQ ID NO: 50)
28. A/SouthCarolina/1/1918 (H1N1) (SEQ ID NO: 51)
1. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60
2. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
ENSHNGKLCL 60
3. MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60
4. MKAILLVLLY TFATANADTL CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDKHNGKLCK 60
5. MEAKLFLVFC AFTALKADTF CVGYHANYST HTVD TILEKN VTVTHSVNLL
ENSHNGKLCS 60
6. MEAKLFLVFC AFTALKADTI CVGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSINLL
ENNHNGKLCS 60
7. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60
8. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60
9. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60
10. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60
11. MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60
12. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60
13. MKAKLLVLLC AFTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60
14. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDNHNGKLCK 60
15. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL

EDSHNGKLCR 60

16. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

17. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

18. MKAKLLVLLC AFTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

19. MKAKLLLILC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

20. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

21. MKAKLLLILC ALTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

22. MKAKLLLILC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

23. MKARLLVLLC ALAATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

24. MKARLLVLLC ALAATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

25. MKARLLVLLC AIAATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

26. MKANLLVLLC ALAAADADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

27. MKAKLLVLLY AFVATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VAVTHSVNLL
EDRHNGKLCR 60

28. MEARLLVLLC AFAATNADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

*:. *::** :: :: ***: ***** ***:::** *::***** *:

1. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISR ESWSYIVEKP NPENGTCYPG
HFADYEELRE 120

2. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP NPENGTCYPG
HFADYEELRE 120

3. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCYPG
YFADYEELRE 120

4. LRGVAPLHLG KCNIAGWILG NPECESLSTA SSWSYIVETP SSDNGTCYPG

DFIDYEELRE 120

5. LNGKIPLQLG NCVAGWILG NPKCDLLTA NSSYIIETS KSKNGACYPG
EFADYEELKE 120

6. LNGKAPLQLG NCVAGWILG NPECDLLTV DSWSYIIETS NSKNGACYPG
EFADYEELRE 120

7. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCTYPG
YFADYEELRE 120

8. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISR ESWSYIVEKP NPENGTCTYPG
HFADYEELRE 120

9. LKGTAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP NPKNGTCYPG
YFADYEELRE 120

10. LKGTAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP NPENGTCTYPG
YFADYEELRE 120

11. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLISK ESWSYIVETP NPENGTCTYPG
YFADYEELRE 120

12. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPKCESLFSK ESWSYIAETP NPENGTCTYPG
YFADYEELRE 120

13. LKGIAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

14. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

15. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

16. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

17. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

18. LKGIAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

19. LKGKAPLQLG NCNIAGWVLG NPECESLLSN RSWSYIAETP NSENGTCYPG
DFADYEELRE 120

20. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

21. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSK RSWSYIAETP NSENGACYPG
DFADYEELRE 120

22. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSK RSWSYIAETP NSENGACYPG

DFADYEELRE 120

23. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVEIP NSENGTCYPG
DFTDYEELRE 120

24. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVETP NSENGTCYPG
DFIDYEELRE 120

25. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVETP NSENGTCYPG
DFIDYEELRE 120

26. LKGIAPLQLG KCNIAGWLLG NPECDLLPV RSWSYIVETP NSENGICYPG
DFIDYEELRE 120

27. LKGIAPLQLG KCNITGWLLG NPECDSLLPA RSWSYIVETP NSENGACYPG
DFIDYEELRE 120

28. LKGIAPLQLG KCNIAGWLLG NPECDLLLTA SSWSYIVETS NSENGTCYPG
DFIDYEELRE 120

: ***:* * :*.:*:*:** **:*: * . *****.*** ***** *

1. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTTT-GVS ASCSHNGESS FYKNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

2. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVS ASCSHNGESS FYRNLWLTG
KNGLYPNLSK 179

3. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVS ASCSHNGKSS FYRNLWLTG
KNGLYPNLSK 179

4. QLSSVSSFER FEIFPKTSSW PNHDSNKGVT AACPHAGAKS FYKNLIWLVK
KGNSYPKLSK 180

5. QLSTVSSFER FEIFPKAISW PDHDATRGTT VACSHSGVNS FYRNLSTVK
KGNSYPKLSK 180

6. QLSTVSSFER FEIFPKATSW PNHDTTRGTT ISCSHSGANS FYRNLWIVK
KGNSYPKLSK 180

7. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVS ASCSHNGKSS FYRNLWLTG
KNGLYPNLSK 179

8. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTTT-GVS ASCSHNGESS FYKNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

9. QLSSVSSFER FEIFPKDSSW PNHTVTKGVT ASCSHNGKSS FYKNLLWLTE
KNGLYPNLSK 180

10. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHNGKSS FYKNLLWLTE
KNGLYPNLSK 180

11. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVT ASCSHNGKSS FYRNLWLTE

KNGLYPNLSN 179

12. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT TSCSHNGKSS FYRNLLWLTK

KNGLYPNVSK 180

13. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHKGRSS FYRNLLWLTK

KNGSYPNLSK 180

14. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHNVTKGVT AACSHKGKSS FYRNLLWLTE

KNGSYPNLSK 180

15. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHSVTRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE

KNGSYPNLSK 180

16. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE

KNGSYPNLSK 180

17. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNVTRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE

KNGSYPNLSK 180

18. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHKGRSS FYRNLLWLTK

KNGSYPNLSK 180

19. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PNHTTR-GVT AACPHARKSS FYKNLVWLTE

ANGSYPNLSR 179

20. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT AACSHKGKSS FYRNLLWLTE

KNGSYPNLNK 180

21. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT AACSHAGKSS FYKNLLWLTE

TDGSYPKLSK 180

22. QLSSVSSFER FEIFPKGRSW PEHNIDIGVT AACSHAGKSS FYKNLLWLTE

KDGSYPNLNK 180

23. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHNTARGVT AACSHAGKSS FYRNLLWLTE

KDGSYPNLKN 180

24. QLSSVSSFER FEIFSKESSW PKHTTG-GVT AACSHAGKSS FYRNLLWLTE

KDGSYPNLNN 179

25. QLSSVTSFER FEIFPKETSW PKHNITTKGVT AACSHAGKCS FYRNLLWLTE

KDGSYPNLNN 180

26. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHNTN-GVT AACSHAGKSS FYRNLLWLTE

KEGSYPKLKN 179

27. QLSSVSSLER FEIFPKESSW PNHTFN-GVT VSCSHRGKSS FYRNLLWLTK

KGDSYPKLTN 179

28. QLSSVSSF EK FEIFPKTSSW PNHETTKGVT AACSYAGASS FYRNLLWLTK

KGSSYPKLSK 180

*****:~::~: *****.* ** ~:* **~: .:~.: * ~*~*~*~* . . ~*~*~*~* . .

1. SYANNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRALYH KENAYVSVVS SHYSRKFTPE
IAKRPKVRDQ 239
2. SYANNKEKEV LVLWGVHHP NIGNQKALYH TENAYVSVVS SHYSRKFTPE
IAKRPKVRDQ 239
3. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGNQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 239
4. SYINDKGKEV LVLWGIHHP TSADQOSLYQ NADAYVSVG SRYSKKFKPE
IAIRPKVRXX 240
5. SYTNNKGKEV LVIWGVHHP TDSVQOTLYQ NKHTYVSVG SKYYKRFTPE
IVARPKVRGQ 240
6. SYTNNKGKEV LVIWGVHHP TDSDQOTLYQ NNHTYVSVG SKYYQRFTPE
IVTRPKVRGQ 240
7. SYANNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 239
8. SYANNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRALYH KENAYVSVVS SHYSRKFTPE
IAKRPKVRDQ 239
9. SYVNKKGKEV LVLWGVHHP NMGDQRAIYH KENAYVSVLS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240
10. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
ITKRPKVRDQ 240
11. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIRDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRGQ 239
12. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240
13. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240
14. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRNQ 240
15. SYVNDKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240
16. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAKRPKVRGQ 240
17. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 240
18. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240

19. SYVNNQEKEV LVLWGVHHP S NIEEQRALYR KDNAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 239

20. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP S NIEDQKTLYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERP KVRGQ 240

21. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP S NIEDQKTLYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERP KVRGQ 240

22. SYVNKKEKEV LILWGVHHP S NIENQKTLYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERP KVRGQ 240

23. SYVNKKGKEV LVLWGVHHP S SIKEQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERP KVRDQ 240

24. SYVNKKGKEV LVLWGVHHP S NIKDQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERP KVRGQ 239

25. SYVNKKGKEV LVLWGVHHP S NIKDQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERP KVRGQ 240

26. SYVNKKGKEV LVLWGIHHP S NSKEQQONLYQ NENAYVSVVT SNYNRRFTPE
IAERP KVRDQ 239

27. SYVNNKGKEV LVLWGVHHP S SSDEQQSLYS NGNAYVSVAS SNYNRRFTPE
IAARP KVKDQ 239

28. SYVNNKGKEV LVLWGVHHP S TGTDQQSLYQ NADAYVSVGS SKYNRRFTPE
IAARP KVRDQ 240

** *.: *** *:***:***. . :*: :* . :*** * : *.*.:*.** *:
****:

1. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRY AFALSRGFGS GIINSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

2. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRY AFALSRGFGS GIINSNAPMD
KCDAKCQTPQ 299

3. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

4. EGRMNYWTL VEPGDKITFE ATGNLVVPRY AFAMERNAGS GIIISDTPVH
DCNTTCQTPK 300

5. AGRMNYWTL FDQGDITIFE ATGNLIAPWH AFALKKGSSS GIMLSDAQVH
NCTTKCQTPH 300

6. AGRMNYWTL LDQGDITIFE ATGNLIAPWH AFALNKGPS S GIMISDAHVH
NCTTKCQTPH 300

7. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRF AFALSRGFGS GIITSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

8. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRY AFALSRGFGS GIINSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

9. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIIISNASMG
ECDAKCQTPQ 300

10. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMG
ECDAKCQTPQ 300

11. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNAPMN
ECDAKCQTPQ 299

12. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

13. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

14. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

15. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNVSM
ECDAKCQTPQ 300

16. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

17. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWH AFALNRGFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

18. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

19. SGRMNYWTL LEPGDTIIFE ATGNLIAPWY AFALSRGPGS GIITSNAPLD
ECDTKCQTPQ 299

20. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWH AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

21. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRDFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

22. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALNRGIGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

23. AGRMNYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH
ECDTKCQTPQ 300

24. AGRINYYWTL LKPGDTIMFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH
ECDTKCQTPQ 299

25. AGRMNYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH
ECNTKCQTPQ 300

26. AGRMNYWTL LKPGDTIIFE ANGNLIAPMY AFALRRGFSGS GIITSNASMH
ECNTKCQTPL 299

27. HGRMNYWTL LEPGDTIIFE ATGNLIAPWY AFALSRRGFES GIITSNASMH
ECNTKCQTPQ 299

28. AGRMNYWTL LEPGDTITFE ATGNLIAPWY AFALNRGSGS GIITSDAPVH
DCNTKCQTPH 300

.*** ::*:*.* ** *.***:.* . ***: *. * *** *:...:
.*:..****

1. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRS AKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

2. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRS AKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

3. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRS AKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

4. GAINSSLPFQ NIHPITIGKC PKYVKSTKLR LATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

5. GALKNNLPLQ NVHLFTIGEC PKYVKSTQLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGRTG 360

6. GALKSNLPLQ NVHPSTIGEC PKYVKSTQLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

7. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRS AKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

8. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRS AKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

9. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNVPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

10. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

11. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

12. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

13. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

14. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

15. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

16. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

17. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

18. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

19. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS VQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

20. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

21. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVKSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

22. GAINSSLPFQ NIHPFTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWDG 360

23. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

24. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

25. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

26. GAINSSLPYQ NIHPVTIGEC PKYVRSKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

27. GSINSNLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQYRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

28. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

::*:*:*:* *:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:* :*:*:*:*:*:* :* *:*:*:*:*
::*:*:* *

1. MVDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVN^SVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

2. MVDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVN^SVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

3. MVDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVN^SVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

4. MVDGWYGYHH QNEQSGSYAA DLKSTQNAID EITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNHLEKR 420
5. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQIAID GINNKANSVI GKMNIQLTSV
GKEFNSLEKR 420
6. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQIAID GINNKVNSII EKMNTQFTSV
GKEFNDLEKR 420
7. MVDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419
8. MVDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419
9. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSII EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420
10. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAID GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 420
11. MMDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419
12. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 420
13. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 420
14. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSII EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420
15. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420
16. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420
17. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420
18. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 420
19. MMDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 419
20. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420
21. MIDGWYGYHH QNEQSGSYAA DQKSTQNAIN WITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

22. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

23. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 420

24. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 419

25. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 420

26. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNIQFTAV
GKEFNKLEKR 419

27. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 419

28. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAID GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLERR 420

*:***** ***** * *****: *****:* **** *****
*****:***:

1. MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

2. MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

3. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

4. IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDYHDSNVK NLYEKVRSQ
KNNAKEIGNG 480

5. KENLNKTVDD RFLDVWTFNA ELLVLENER TLEFHDLNIK SLYEKVKSHL
RNNDKEIGNG 480

6. IENLNKKVDD GFLDVWTYNA ELLILLENER TLDFHDFNVK NLYEKVKSQ
RNNAKEIGNG 480

7. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

8. MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

9. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDLNVK NLYEKVKNQ
KNNAKEIGNG 480

10. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKTQ
KNNAKEIGNG 480

11. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 479

12. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENGR TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

13. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

14. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

15. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

16. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

17. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

18. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

19. MENLNKKVDD GFMDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 479

20. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

21. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 480

22. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 480

23. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLILLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
RNNAKEIGNG 480

24. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 479

25. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
RNNAKEIGNG 480

26. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 479

27. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDLNVK NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 479

28. IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVR NLYEKVKSQL
KNNAKEIGNG 480

:*****:***** **:* ***** ***:***** * ***:** **: *****:.*
:*****:***

1. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

2. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

3. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

4. CFEFYHKCDN TCMESVKNGT YDYPKYSEEA KLNREEIDGV KLESTRIYQI
LAIYSTVASS 540

5. CFEFYHKRDN ECLECVKNGT YNYPKYSEES KFNREEIVGV KLESMGIHQI
LAIYSTVASS 540

6. CFEFYHKCDN ECMESVKNGT YNYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVHQI
LAIYSTVASS 540

7. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNRRERIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

8. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

9. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSKES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

10. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

11. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

12. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNRGKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

13. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

14. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

15. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

16. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

17. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

18. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

19. CFEFYHKCDN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYRI
LAIYSTVASS 539

20. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

21. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

22. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKFSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

23. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

24. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTAASS 539

25. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

26. CFEFYHKCDN ECMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREKVDGV KLESMGIYQI
LAIYSTVASS 539

27. CFEFYHKCDN ECMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

28. CFEFYHKCDD ACMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREEIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

*****: : *****:*** *****:*:*: ***** .:*** ***** :*:*

*****.***

1. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
2. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
3. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
4. LVLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
5. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRVCI 566
6. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
7. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
8. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
9. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
10. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
11. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
12. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566

13.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
14.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
15.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
16.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
17.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
18.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
19.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	565
20.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
21.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
22.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
23.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
24.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	565
25.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566
26.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	565
27.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	565
28.	LVLLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI	566

:** ***** *****

Таблица 4

Полипептиды, экспрессированные в *P. pastoris*. Экспрессию и связывание CR6261 определяли, как описано, и рассчитывали отношение сигналов связывания и экспрессии.

Набор 1

Клон	Сигнал связывания CR6261	Сигнал HTRF	Отношение	Кратность увеличения уровня по сравнению с исходной H1 mini-NA	Область гибридного пептида				В-петля				
					337	340	352	353	402	406	409	413	416
					E, I, K, V	I, K, R, T	D, F, V, Y	I, K, R, T	E, K, M, V	F, I, N, S, T, Y	A, G, I, R, T, V	F, I, N, S, T, Y	H, I, L, N, R, S
239E11	1076944	1492	721,81	121,52	K	I	Y	T	M	F	I	N	R
127H1	800024	6572	121,73	20,49	K	K	F	T	M	Y	I	Y	S
171E5	879704	11508	76,44	12,87	K	T	F	T	M	I	A	F	S
239D2	570424	9279	61,47	10,35	K	K	F	T	M	I	V	F	N
247B2	414984	7583	54,73	9,21	K	I	Y	T	V	Y	I	F	S
253D4	395824	7546	52,45	8,83	K	T	F	T	M	Y	A	Y	H
252F5	421824	8621	48,93	8,24	V	K	Y	T	M	Y	V	Y	N
220C9	1086064	22606	48,04	8,09	K	T	F	T	M	F	T	Y	L
125D3	139824	2937	47,61	8,02	K	K	F	T	M	Y	G	T	H
137C11	416504	9167	45,44	7,65	V	K	F	T	M	Y	I	N	H
131B5	844344	20419	41,35	6,96	K	T	F	T	M	I	V	Y	H
233F11	583024	14389	40,52	6,82	K	K	Y	T	M	T	I	G	S
234C5	377864	9465	39,92	6,72	I	I	Y	T	M	F	T	N	L
115A1	1176904	30389	38,73	6,52	K	K	Y	T	M	I	V	Y	I
185G7	505864	13560	37,31	6,28	K	K	Y	T	M	I	V	I	S
275D4	327344	9030	36,25	6,10	K	K	Y	T	M	T	T	S	S
244B8	273744	7757	35,29	5,94	I	T	Y	T	M	Y	A	I	S
252B8	284984	8252	34,54	5,81	K	I	Y	T	M	S	I	N	L
213C11	667024	20624	32,34	5,44	V	K	Y	T	M	I	V	F	H
174G3	491184	15320	32,06	5,40	K	T	Y	K	V	S	G	Y	L
125D10	133904	4241	31,57	5,31	K	I	Y	T	M	Y	V	N	R
127A7	233064	7498	31,08	5,23	E	T	Y	T	M	I	I	I	L
304G11	110504	3588	30,8	5,19	K	K	Y	K	M	F	T	F	S
162A11	364024	11939	30,49	5,13	V	K	Y	T	M	F	A	F	I
271F10	315304	10348	30,47	5,13	I	K	Y	T	M	I	A	I	L
218G11	958504	33710	28,43	4,79	I	T	Y	I	M	I	I	I	N
251C8	269544	9634	27,98	4,71	K	T	Y	K	M	Y	I	N	L
258A6	165624	6004	27,59	4,64	I	T	Y	T	M	Y	T	F	H
134A4	456304	17366	26,28	4,42	K	I	Y	I	M	I	A	Y	N
214C11	317904	12120	26,23	4,42	E	I	Y	T	M	Y	V	S	S
182G8	399864	15262	26,2	4,41	K	K	Y	T	M	T	V	I	I
113E7	966064	38018	25,41	4,28	K	K	F	T	M	Y	T	I	H
230G9	854584	34093	25,07	4,22	K	K	Y	T	M	Y	T	F	R
222G4	419064	16996	24,66	4,15	K	T	F	I	V	I	I	Y	L
182D7	418944	17096	24,51	4,13	I	T	Y	T	M	I	I	F	N
272H2	263264	10844	24,28	4,09	K	T	Y	T	M	S	A	N	H
191C8	309064	12753	24,23	4,08	I	T	Y	T	V	I	A	F	I
123C10	237824	9843	24,16	4,07	K	I	Y	K	M	F	A	T	L
284B9	1663504	70812	23,49	3,95	K	T	Y	R	M	I	R	T	L
134A3	531784	23414	22,71	3,82	K	K	F	I	M	I	I	N	S
188F4	287384	12888	22,3	3,75	K	K	Y	T	M	S	V	T	H
189B7	336344	15207	22,12	3,72	E	T	F	T	M	Y	V	F	N
148D5	329144	14994	21,95	3,70	E	T	Y	I	M	F	G	S	H
194C8	242304	11113	21,8	3,67	I	T	F	T	M	F	V	F	I
188A8	279144	13001	21,47	3,61	K	T	Y	K	M	F	V	S	I
162B3	279584	13159	21,25	3,58	V	T	Y	T	M	Y	T	N	N
204C5	832784	39330	21,17	3,56	V	K	F	T	V	I	I	Y	L
216E5	334904	15873	21,1	3,55	V	T	F	T	M	F	R	Y	R
129C2	199464	9486	21,03	3,54	V	R	Y	I	M	I	I	Y	S
286E8	158704	7662	20,71	3,49	E	I	F	T	M	F	I	Y	S
264G4	180504	8751	20,63	3,47	K	R	Y	T	V	I	V	F	S
214C4	302264	14709	20,55	3,46	I	I	F	T	V	F	A	S	S
125A8	212224	10327	20,55	3,46	K	I	F	T	V	I	V	Y	I

Набор 1

Клон	Сигнал связывания CR6261	Сигнал НТRF	Отношение	Кратность увеличения уровня по сравнению с исходной mini-HA	Область гибридного пептида				В-петля				
					337	340	352	353	402	406	409	413	416
					E, I, K, V	I, K, R, T	D, F, V, Y	I, K, R, T	E, K, M, V	F, I, N, S, T, Y	A, G, I, R, T, V	F, I, N, S, T, Y	H, I, L, N, R, S
123G2	498584	24442	20,4	3,43	I	T	Y	I	M	Y	T	F	L
187C6	345464	16932	20,4	3,43	E	K	Y	K	M	F	I	I	H
134H10	591704	29253	20,23	3,41	K	T	Y	T	V	I	T	F	I
187H10	299224	15289	19,57	3,29	K	T	Y	I	M	I	G	F	L
101D4	336584	17243	19,52	3,29	I	K	Y	I	M	I	I	S	N
193B6	206904	10650	19,43	3,27	K	K	Y	R	M	F	I	S	N
137C5	295944	15406	19,21	3,23	I	R	F	T	V	I	I	N	N
112F3	449824	24169	18,61	3,13	V	R	F	I	M	I	I	Y	S
176A5	193104	10476	18,43	3,10	I	T	F	T	V	F	I	F	I
213B2	131704	7178	18,35	3,09	K	K	Y	T	M	T	V	F	L
307A10	114984	6348	18,11	3,05	I	K	F	T	M	Y	G	Y	H
126C3	219944	12413	17,72	2,98	E	T	F	I	M	F	G	T	I
263B6	151184	8800	17,18	2,89	I	T	Y	I	M	S	T	Y	I
138F11	147864	8788	16,83	2,83	E	R	Y	R	M	F	V	F	L
134D3	303504	18129	16,74	2,82	E	R	F	I	M	Y	T	F	S
131D5	344504	20857	16,52	2,78	V	T	Y	I	V	I	A	F	S
138F8	347704	21081	16,49	2,78	K	T	Y	I	M	Y	A	F	H
301F11	116904	7108	16,45	2,77	V	T	F	T	V	Y	I	S	H
112G6	543944	33149	16,41	2,76	V	R	Y	I	M	F	I	S	I
245C9	180024	10980	16,4	2,76	V	R	F	T	V	F	V	T	L
123E2	477064	29184	16,35	2,75	V	T	Y	T	V	F	V	F	S
266A11	90584	5696	15,9	2,68	V	T	Y	T	M	Y	I	T	R
104C4	521224	34458	15,13	2,55	V	K	Y	I	M	F	G	F	N
194E4	408584	27424	14,9	2,51	E	K	F	T	M	I	T	F	I
206B11	358744	24697	14,53	2,45	V	R	Y	T	M	F	T	I	L
192C4	343184	23932	14,34	2,41	K	T	Y	K	M	I	V	T	N
125F3	317384	22785	13,93	2,35	I	T	F	T	M	I	A	Y	R
145C9	182344	13108	13,91	2,34	I	T	F	I	V	Y	I	S	N
243D6	132144	9596	13,77	2,32	I	R	F	T	M	N	V	Y	R
182D3	142664	10487	13,6	2,29	I	T	Y	R	M	F	A	G	S
181H9	310504	23153	13,41	2,26	V	K	F	I	M	F	V	F	N
163E3	183544	14033	13,08	2,20	E	K	Y	K	M	I	V	I	L
145E7	132224	10312	12,82	2,16	I	T	F	K	V	I	I	F	S
275G3	115104	9180	12,54	2,11	V	T	Y	I	M	T	A	S	S
191D5	123824	10048	12,32	2,07	I	R	F	T	M	T	G	F	S
188G10	142504	11593	12,29	2,07	V	T	Y	I	V	I	A	F	S
171F6	140464	11555	12,16	2,05	K	T	Y	T	M	S	T	Y	L
125C2	83624	7009	11,93	2,01	I	I	F	T	V	I	T	S	S
206B8	285824	24166	11,83	1,99	V	I	Y	T	M	I	T	F	H
145F2	498504	42457	11,74	1,98	I	K	F	T	M	F	R	F	S
199F3	328504	29850	11,01	1,85	K	T	Y	T	M	N	G	S	S
181H11	186664	17205	10,85	1,83	V	T	Y	T	M	I	I	N	R
188C8	113344	10520	10,77	1,81	I	K	Y	T	M	S	T	Y	L
189E10	188864	18252	10,35	1,74	K	T	Y	T	M	S	G	S	S
146G7	533864	52422	10,18	1,71	V	T	Y	I	M	Y	T	T	I
182H2	109624	10976	9,99	1,68	K	I	F	T	V	I	I	T	L
262B9	94744	9584	9,89	1,66	I	K	Y	T	M	F	R	F	R
145E8	211504	21732	9,73	1,64	E	K	F	K	V	I	V	F	I
249B11	145184	14995	9,68	1,63	K	K	F	T	M	S	T	G	H
182C6	92944	9939	9,35	1,57	K	R	D	I	M	F	I	N	N
SEQID NO: 6 AV + 2SD			9,28	1,56									
SEQID NO: 6 AV	238077	40100	5,94	1,00									

Таблица 5

Полипептиды, экспрессированные в *P. pastoris*. Экспрессию и связывание CR6261 определяли, как описано, и рассчитывали отношение сигналов связывания и экспрессии.

Набор 2

Клон	Сигнал связывания CR6261	Сигнал HTRF	Отношение	Кратность увеличения уровня по сравнению с исходной SEQ ID NO: 6	Область гибридного пептида				В-петля				
					337	340	352	353	402	406	409	413	416
					A, E, I, K, T, V	F, I, N, S, T, Y	A, D, F, I, N, S, T, V, Y	E, G, I, K, R, V	M, R, T	F, H, L, Y	F, I, S, T	E, K, M, V	I, L, R, S
86B4	1077144	13862	77,7	13,08	K	N	Y	K	M	F	I	M	I
7A7	987824	13452	73,43	12,36	T	N	Y	V	M	Y	F	E	R
55G7	616184	8767	70,28	11,83	K	N	Y	V	M	Y	I	M	L
71H2	1109984	16750	66,27	11,16	K	N	F	K	M	L	I	V	S
86B3	900904	14448	62,35	10,50	K	N	Y	K	M	L	I	V	R
71A4	1064144	17597	60,47	10,18	T	N	Y	V	M	Y	F	E	R
51G3	460304	7773	59,22	9,97	T	I	F	V	M	L	F	E	S
84B8	582144	10091	57,69	9,71	K	N	Y	I	M	F	F	M	S
79C2	364184	7116	51,18	8,62	T	N	Y	R	M	F	T	V	S
69G8	481344	9479	50,78	8,55	I	N	F	R	M	L	I	V	L
79D5	702584	13981	50,25	8,46	A	N	F	K	M	L	F	V	L
54H4	291744	5857	49,81	8,39	K	I	Y	K	M	L	I	E	L
11H6	427384	9146	46,73	7,87	K	N	Y	E	M	F	T	E	S
90A9	413664	9025	45,84	7,72	K	S	Y	V	M	Y	T	V	S
75G5	1011384	26695	37,89	6,38	E	S	Y	V	M	L	F	E	R
8A10	360104	9630	37,39	6,29	K	N	Y	V	M	L	I	V	R
72D4	329944	8881	37,15	6,25	V	N	F	R	M	F	S	M	S
74H9	1283144	35494	36,15	6,09	K	N	F	K	M	Y	F	M	S
88C5	471424	13355	35,3	5,94	K	N	Y	R	M	L	I	V	R
61A9	383064	10864	35,26	5,94	T	N	F	R	M	F	F	E	L
86H9	457344	13340	34,28	5,77	K	N	F	G	M	F	T	V	S
71D3	1573024	46711	33,68	5,67	I	S	Y	V	M	F	I	V	L
9C6	270984	8235	32,91	5,54	K	T	Y	V	M	Y	T	K	I
81F11	317824	9964	31,9	5,37	K	I	F	V	M	F	F	V	S
84E10	255064	7996	31,9	5,37	I	N	F	R	M	F	S	V	S
71C4	1350144	44339	30,45	5,13	K	N	F	G	M	F	I	V	S
84D3	84424	2920	28,91	4,87	E	N	F	K	M	L	I	E	S
96H8	205904	7224	28,5	4,80	K	Y	Y	K	M	F	I	M	S
85A7	235704	8416	28,01	4,72	K	N	Y	E	M	L	F	V	R
50G10	264144	9470	27,89	4,70	T	N	F	E	M	F	F	V	S
6A1	299824	10912	27,48	4,63	A	N	F	R	M	F	F	M	S
91C4	1157424	44837	25,81	4,35	K	N	F	G	M	L	I	M	R
2C4	258264	10139	25,47	4,29	I	N	F	V	M	F	I	V	L
63C3	188184	7625	24,68	4,15	E	T	Y	K	M	L	F	V	L
850	196024	8115	24,16	4,07	K	N	V	G	M	F	F	V	I
67C10	306104	12907	23,72	3,99	E	T	F	V	M	F	F	M	L
10F9	165984	7113	23,34	3,93	I	I	Y	V	M	Y	F	E	R
4C1	385504	16548	23,3	3,92	K	N	S	V	M	F	I	E	I
86G3	183944	7995	23,01	3,87	T	S	Y	V	M	F	T	V	L
51G10	215264	9727	22,13	3,73	A	N	Y	R	M	F	I	K	S
58A5	90744	4142	21,91	3,69	V	T	F	R	M	L	I	M	S
56F8	235344	10823	21,74	3,66	I	N	F	E	M	F	T	E	L
67C11	209184	9856	21,22	3,57	K	Y	Y	I	M	F	F	E	I
91C8	333584	16012	20,83	3,51	K	N	F	G	M	L	I	K	S
48B11	302864	14946	20,26	3,41	I	N	A	G	M	L	I	E	S
78F11	84104	4155	20,24	3,41	I	I	F	R	M	Y	F	E	I

Таблица 6

Полипептиды, экспрессированные в HEK293F. Экспрессию и связывание CR6261 определяли, как описано, и рассчитывали отношение сигналов связывания и экспрессии. Мутации, включенные в каждый клон, указаны в Таблице 4 и 5.

Клон	Сигнал связывания CR6261	Сигнал HTRF	Отношение	Кратность увеличения уровня по сравнению с исходной SEQ ID NO: 6
127H1	24150000	327363	73,77	4,25
86B4	19970680	334887	59,63	3,44
171E5	6625080	235511	28,13	1,62
7A7	6191080	242461	25,53	1,47
71H2	21080360	336346	62,67	3,61
220C9	8493560	162872	52,15	3,00
131B5	5725640	139561	41,03	2,36
115A1	9557640	175377	54,50	3,14
74H9	26144240	344988	75,78	4,37
71C4	6413600	214495	29,90	1,72
91C4	8442400	245138	34,44	1,98
113E7	13005960	260748	49,88	2,87
6E12	15326000	309443	49,53	2,85
181H9	11892520	324690	36,63	2,11
SEQ ID NO: 6 AV	5661550	326077	17,36	1,00

Таблица 7

Вариабельность природной последовательности в указанных положениях в % от общего числа последовательностей для каждого подтипа

положение	аминокислота	H1	H3	H5	H7
337	V	67	99	19	100
	I	32	1	2	
	T	0,8		3	
	S			73	
	Y			0,1	
	N			0,5	

	A			2	
	G			0,1	
340	I	99		21	98
	V	0,43			
	T	0,03	0,5		
	K		97		
	R		2	47	
	G			29	
	E			0,3	
	S				2
352	F	100	100	100	100
353	I	99,9	100	100	100
	L	0,1			
402	M	100		100	
	T		99,8		100
	S		0,02		

Таблица 8

Очистка и сила связывания mAb полипептидов по настоящему изобретению

	SEQ ID NO:	Объем супернатанта (мл)	Выход (мг/л культуры)	Чистота по HP-SEC (%)	K_d^{app} CR6261 (нМ)	K_d^{app} CR9114 (нМ)
s127H1	35	1376	9,0	100,0	130	10
s86B4	36	1380	9,0	96,0	150	13
s55G7	37	1460	18,1	100,0	150	9
s74H9	34	1335	11,3	99,7	130	10
s6E12	38	1479	13,1	90,8	390	34

Таблица 9

Молекулярный вес, определенный с помощью SEC-MALS для полипептидов по настоящему изобретению и их комплексов с Fab-фрагментами CR6261 и CR9114. Теоретические (теор.) значения оценивают на основании последовательности полипептида по настоящему изобретению (предполагая мономер) и дополнительного вклада приблизительно 10 кДа от присоединенных гликанов. Значения молекулярного веса Fab-фрагментов CR6261, CR9114 и CR8020 также определяли с помощью SEC-MALS, и они составили 48, 49 и 47 кДа, соответственно.

	SEQ ID NO:	Мол. вес (кДа)		Мол. вес комплекса с CR6261 (кДа)		Мол. вес комплекса с CR9114 (кДа)	
		Теор.	Наблюдаемый	Теор.	Наблюдаемый	Теор.	Наблюдаемый
s127H1	35	40	39	87	74	86	83
s86B4	36	40	40	88	75	87	83
s55G7	37	40	40	90	66	87	80
s74H9	34	40	41	89	72	88	83
s6E12	38	40	40	88	67	87	80

ССЫЛКИ

- Bommakanti et al. (2010), PNAS 107(31): 13701-13706.
 Bommakanti et al. (2012), J Virol 86: 13434
 Coffman et al. (2010), Immunity 33: 492.
 Devereux et al. (1984), Nucl. Acids Res. 12: 387.
 Dopheide T.A., Ward C.W. (1981) *J Gen Virol.* 367-370.
 Ekiert et al. (2009), Science 324:246.
 Ekiert et al. (2011), Science 333: 844.
 Ferguson et al. (2003), Nature 422: 428-443.
 Lorieau et al. 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 11341.
 Steel et al. (2010), mBio 1(1): 1-9.
 Steven et al (2004) Science 303: 1866
 Steven et al (2006) Science312: 404
 Throsby et al. (2008), Plos One 12(3): 1-15.
 Wilson et al (1981) Nature 289: 366

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO 1: Полноразмерный H1 (A/Brisbane/59/2007)

MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 ENSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP 100
 NPENGTCPYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA 150
 SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPN 200
 IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL 250
 EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRRGFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG 300
 AINSSLPFQN VHPVTIGECF KYVRSKLRM VTGLRNIPSI QSRGLFGAIA 350
GFIEGGWTGM VDGWYGYHHQ NEQSGGYAAD QKSTQNAING ITNKVNSVIE 400
MNTQFTAVG KEFNKLERRM ENLNKKVDDG FIDIWTYNAE LLVLENERT 450
 LDFHDSNVKN LYEKVKSQK NNAKEIGNGC FEFYHKCNDE CMESVKNGTY 500
 DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLVSLGAIS 550
 FWMCSNGSLQ CRICI 565

SEQ ID NO: 2: H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4

MKVKLLVLLC TFTATYA DTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL RNIPSIIQSQ LFGAIAGFIE GGWTGMVDGW 100
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEMNT QSTATGKEGN 150
KSERMKQIED KIEEIESKQI WCYNAELLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200
 VKSQKNNAK EIGNGCFEFY HCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250
 KIDGVKLESM GVYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAISFWMCSNGSLQCRIC 300
 I 301

SEQ ID NO: 3: фолдон

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO: 4: FLAG-тромбин-фолдон-HIS

SGRDYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHH

SEQ ID NO: 5:

MKQIEDKIEEIESKQ

SEQ ID NO: 6: H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 без лидерной последовательности и с FLAG-тромбин-фолдон-HIS

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNIPSIQ
 SQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 STATGKEGNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 NNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVSGRDYKDDDDKLV
 PRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHH

SEQ ID NO: 7:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA

SEQ ID NO 8: остаток консенсусной последовательности H1 402-
418 (нумерация согласно SEQ ID NO:1)

402 MNTQFTAVG KEFN(H/K)LE(K/R) 418

>SC09-114 VH, БЕЛОК (SEQ ID NO: 11)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCSSGGTSNNYAI SWVRQAPGQGLDWMGGISPIFGSTAY
AQKFQGRVTISADIFSN TAYMELNSLTSED TAVYFCARHGNY YYYSGMDVWGQGT T V T V S S

>SC09-114 VL, БЕЛОК (SEQ ID NO: 12)

SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVN WYQQFPGTAPKLLIYSNDQRPSVVP
DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAEYCAAWDDSLKGAVFGGGTQLTVL

>CR6261 VH, БЕЛОК (SEQ ID NO: 9)

E V Q L V E S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G P F R
S Y A I S W V R Q A P G Q G P E W M G G I I P I F G T T K Y A P
K F Q G R V T I T A D D F A G T V Y M E L S S L R S E D T A M Y
Y C A K H M G Y Q V R E T M D V W G K G T T V T V S S

>CR6261 VL, БЕЛОК (SEQ ID NO: 10)

Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S N I G
N D Y V S W Y Q Q L P G T A P K L L I Y D N N K R P S G I P D R
F S G S K S G T S A T L G I T G L Q T G D E A N Y Y C A T W D R
R P T A Y V V F G G G T K L T V L G

>SC08-057 VH, БЕЛОК (SEQ ID NO: 13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDSVIFMSWVRQAPGKGLECVSIIYIDDSITYYA
DSVKGRFTISRHN SMGTVFLEMNSLRPDDTAVYYCATESGDFGDQTGPYHYAMDV

>SC08-057 VL, БЕЛОК (SEQ ID NO: 14)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSGDIGGYN AVSWYQHHPGKAPKLM IYEVTSRPSGV
SDRFSASRSGDTASLTVSGLQAEDEAHYYCCSFADSNILI

>SC08-020 VH, БЕЛОК (SEQ ID NO: 17)

QVQLQQSGAEVKT PGASVKVSCASGYTFTRFGVSWIRQAPGQGLEWIGWISAYNGDTYY
AQKFQARVTMTTDTSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDN

>SC08-020 VL, БЕЛОК (SEQ ID NO: 18)

EIVXTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIP
DRISGSGSGTDFTLTISRLEPADFAVYYCQQYGTSPRT

SEQ ID NO: 55: 127H1

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI

NGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERITLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 56 : 86B4

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERITLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 59 : 55G7

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKL
 RMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGIT
 NKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERITLDFHDS
 NVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK
 LESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 57 : 74H9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQYTAIFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERITLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 60 : 115A1

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERITLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 61 : 71H2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVKNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERITLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 62 : 181H9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNVPSKQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI

NGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 58 : 6E12

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNEPSNQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQLTAFGKEVNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 63 : 220C9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSTQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 64 : 113E7

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAI
 NGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLD
 FHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 65: s74H9

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQ
 SQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 YTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 LNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 66: s127H1

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQ
 SQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 YTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 LNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 67: s86B4

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQ
 SQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ

FTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 68: s55G7

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQ
 SQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 YTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 69: s6E12

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSNQ
 SQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 LTAFGKEVNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 72: s74H9-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQ
 SQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 YTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 73: s127H1-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQ
 SQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 YTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 74: s86B4-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQ
 SQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 FTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNRE KIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 75: s55G7-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQ
 SQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
 YTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 76: s6E12-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSNQ
SQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ
LTAFGKEVNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид стеблевого домена гемагглютинаина (НА) вируса гриппа, содержащий (а) домен НА1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент НА1, содержащий аминокислоты от положения 1 по положение x , предпочтительно от положения p по положение x домена НА1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с С-концевым стеблевым сегментом НА1, содержащим аминокислоты от положения y до С-концевой аминокислоты, включительно, из домена НА1, и (b) домен НА2 гемагглютинаина вируса гриппа, где полипептид стеблевого домена гемагглютинаина устойчив к расщеплению протеазой на стыке между НА1 и НА2, и где одна или несколько аминокислот в положениях 337, 340, 352, 353, 402, 406, 409, 413 и/или 416 были мутированы по сравнению с соответствующими положениями в НА вируса гриппа дикого типа.

2. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по п. 1, где домены НА1 и НА2 получены из A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1).

3. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по п. 1 или п. 2, где x представляет собой 52, $y=321$, и $p=18$.

4. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-3, где аминокислотная последовательность от положения (или эквивалентного) 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529 или 530 домена НА2 до С-конца домена НА2 была удалена.

5. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-4, где

мутированная аминокислота в положении 337 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;

мутированная аминокислота в положении 340 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

мутированная аминокислота в положении 352 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, V, Y, A, I, N, S и T;

мутированная аминокислота в положении 353 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из К, R, T, E, G и V;

мутированная аминокислота в положении 402 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

мутированная аминокислота в положении 406 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

мутированная аминокислота в положении 409 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

мутированная аминокислота в положении 413 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K и V; и

мутированная аминокислота в положении 416 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

6. Полипептид стеблевого домена HA вируса гриппа по любому из пп. 1-5, где полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN X_1 PS X_2 QSQGLFGAIAG X_3 X_4 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK X_5 NTQ X_6 TAX X_7 GKEX X_8 NK X_9 ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVSGRDYKDDD
DKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHH (SEQ ID NO: 53),

где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;

X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X_3 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X_4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X_5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

7. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-5, где полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN**X**₁PS**X**₂QSQGLFGAIAG**X**₃**X**₄EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK**X**₅NTQ**X**₆TAX**X**₇GKEX**X**₈NK**X**₉ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDG (SEQ ID NO: 54),

где

X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;

X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

8. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому

из пп. 1-5, где полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN X_1 PS X_2 QSQGLFGAIAG X_3 X_4 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK X_5 NTQ X_6 TAX X_7 GKE X_8 NK X_9 ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG (SEQ ID NO: 70),

где

X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;

X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X_3 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X_4 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X_5 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X_6 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X_7 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X_8 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X_9 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

9. Полипептид стеблевого домена HA вируса гриппа по любому из пп. 1-5, где полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN X_1 PS X_2 QSQGLFGAIAG X_3 X_4 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK X_5 NTQ X_6 TAX X_7 GKE X_8 NK X_9 ERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 71),

где

X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из группы,

состоящей из E, I, K, V, A и T;

X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;

X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;

X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;

X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, K, M, V, R и T;

X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;

X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

X₉ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

10. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-9, где полипептиды содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55-76.

11. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-10, где полипептиды содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 73.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-11.

13. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12.

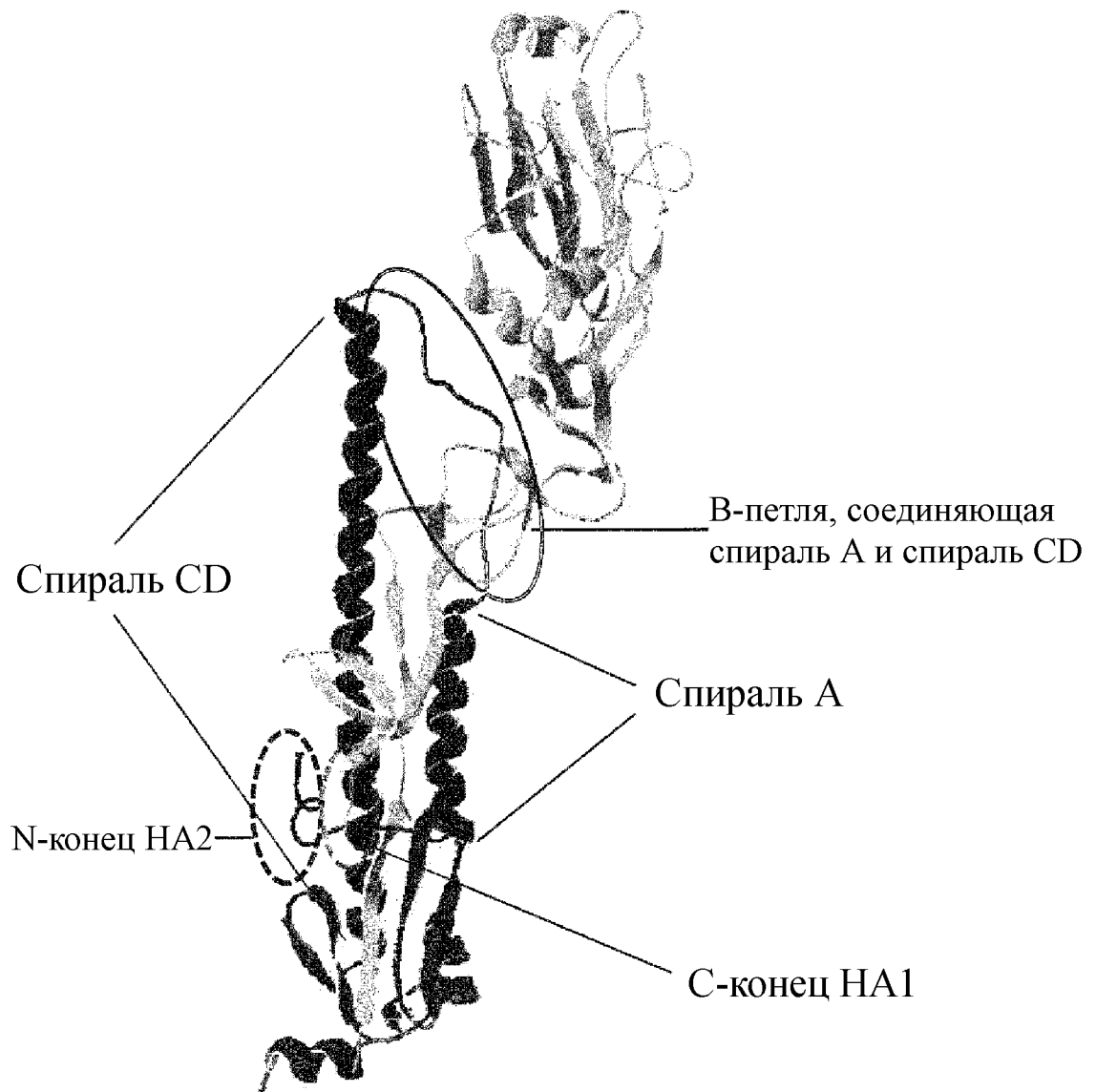
14. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-11 и/или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12 и/или вектор по п. 13.

15. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-11, нуклеиновая кислота по п. 12 и/или композиция по п. 14 для применения в качестве лекарственного препарата, в частности, для применения в качестве вакцины.

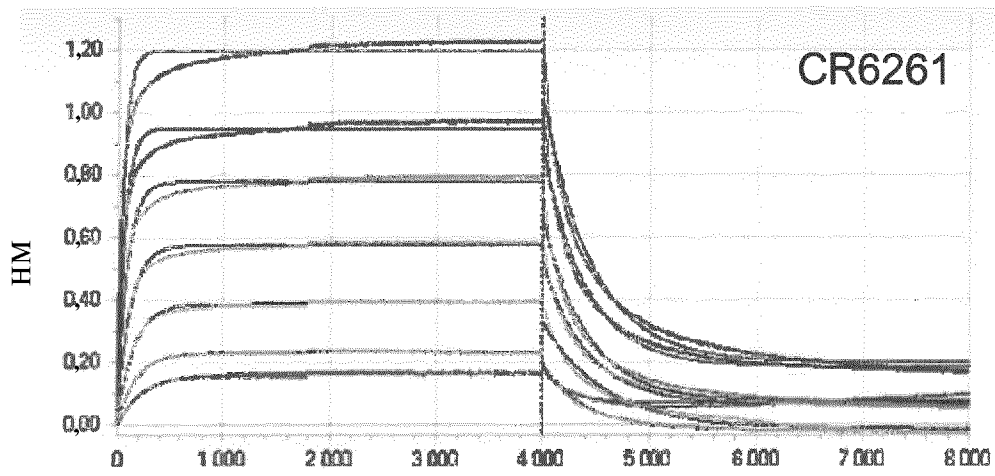
16. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-11, молекула нуклеиновой кислоты по п. 12 и/или композиция по п. 14 для применения в индуцировании иммунного ответа против белка НА вируса гриппа.

17. Полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 1-11, молекула нуклеиновой кислоты по п. 12 и/или композиция по п. 14 для применения в профилактике и/или лечении инфекции вируса гриппа.

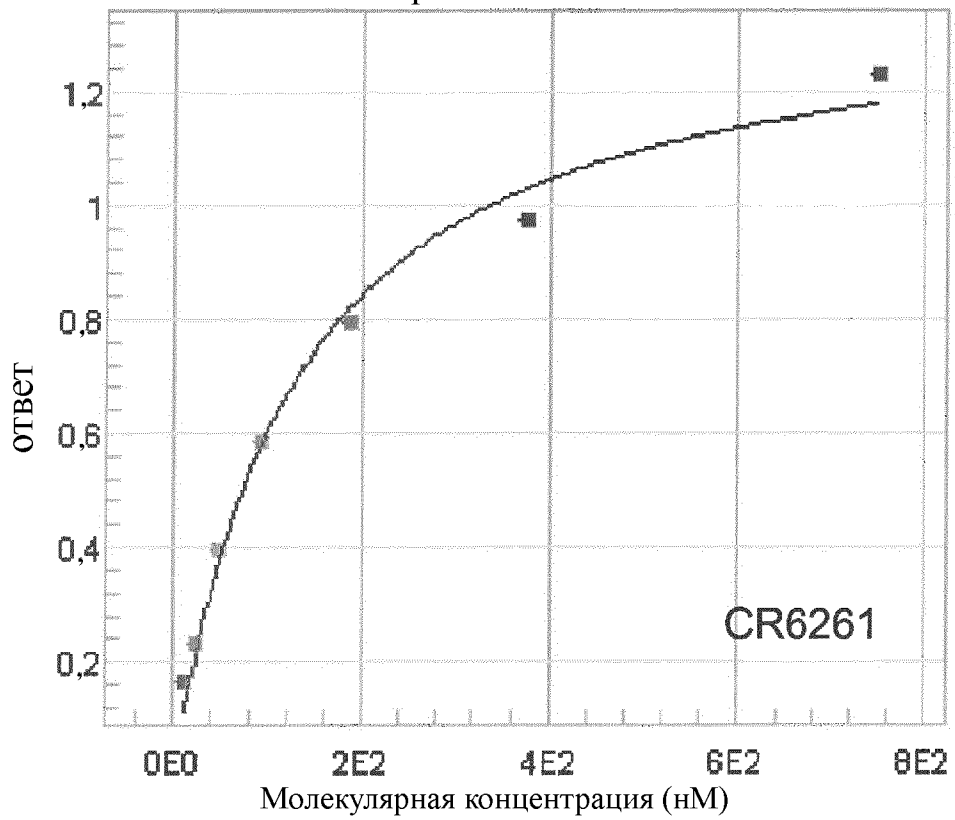
По доверенности



Фиг. 1

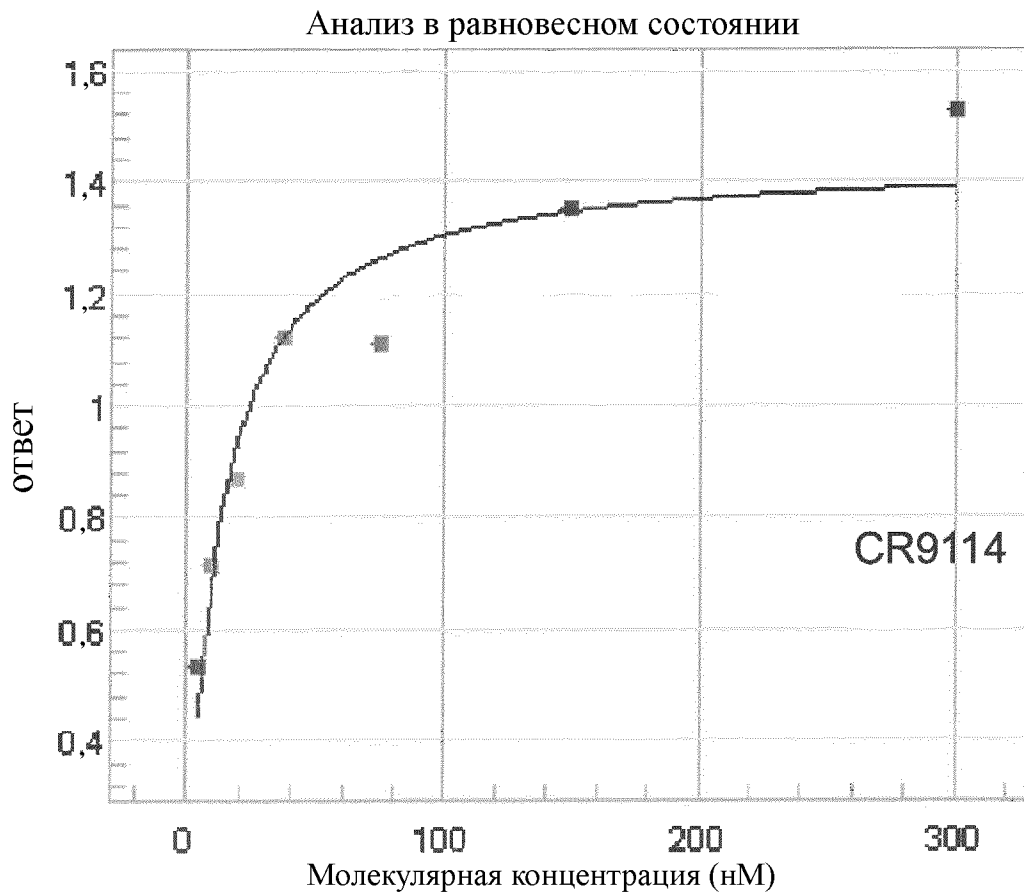
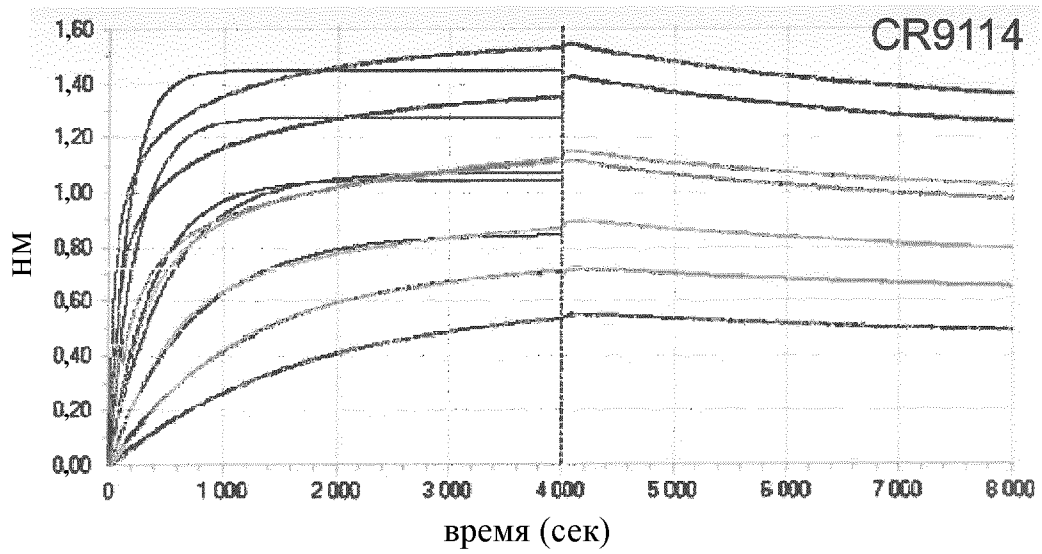


Анализ в равновесном состоянии



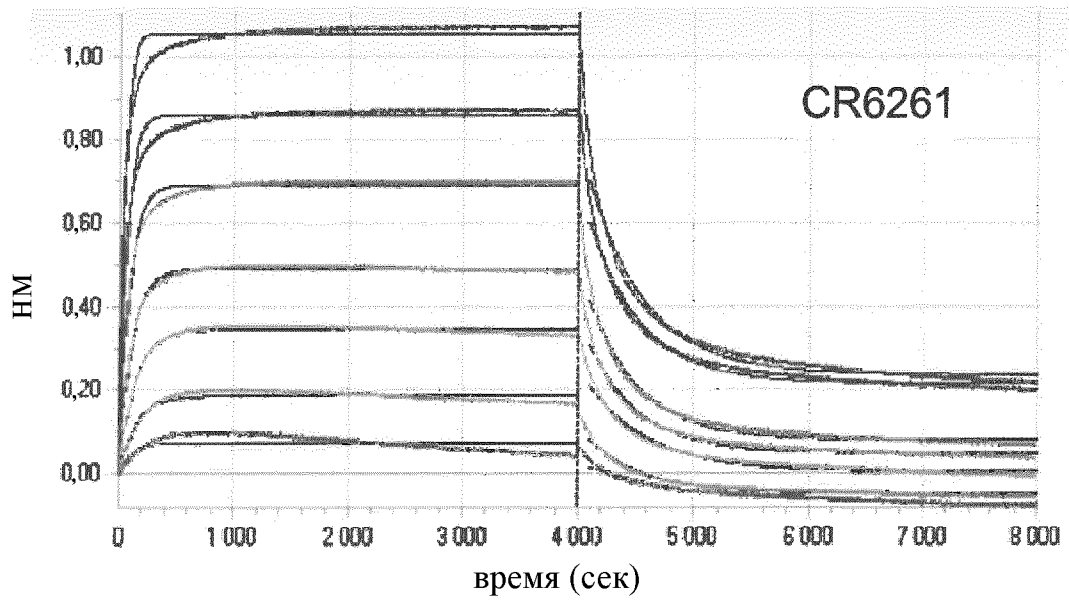
Фиг. 2А

s127H1 SEQ ID NO: 66

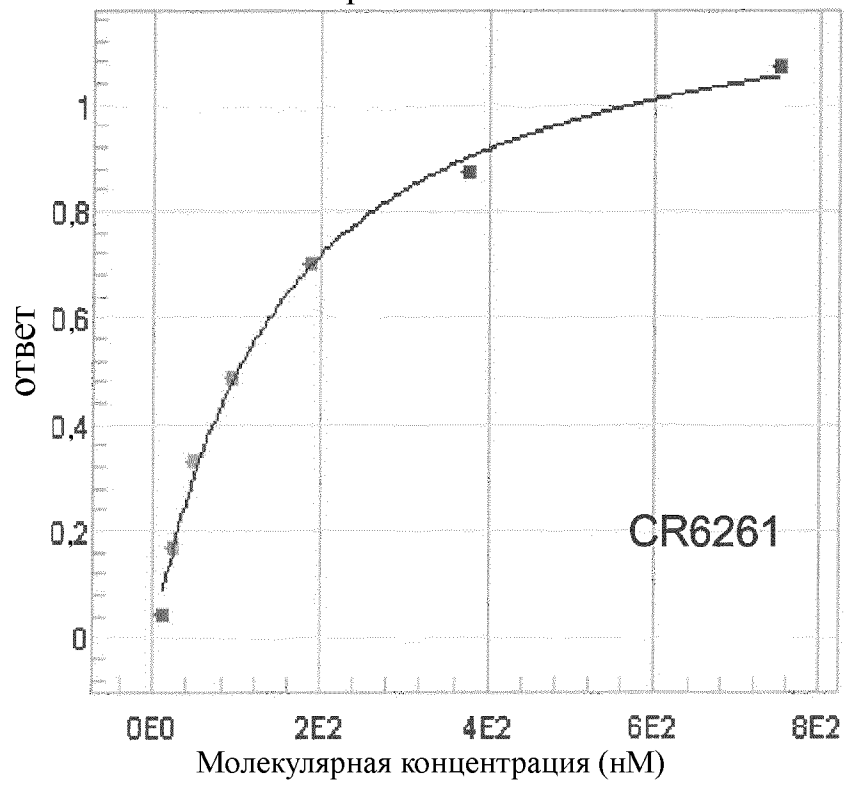


Фиг. 2А – продолжение

s127H1 SEQ ID NO: 66

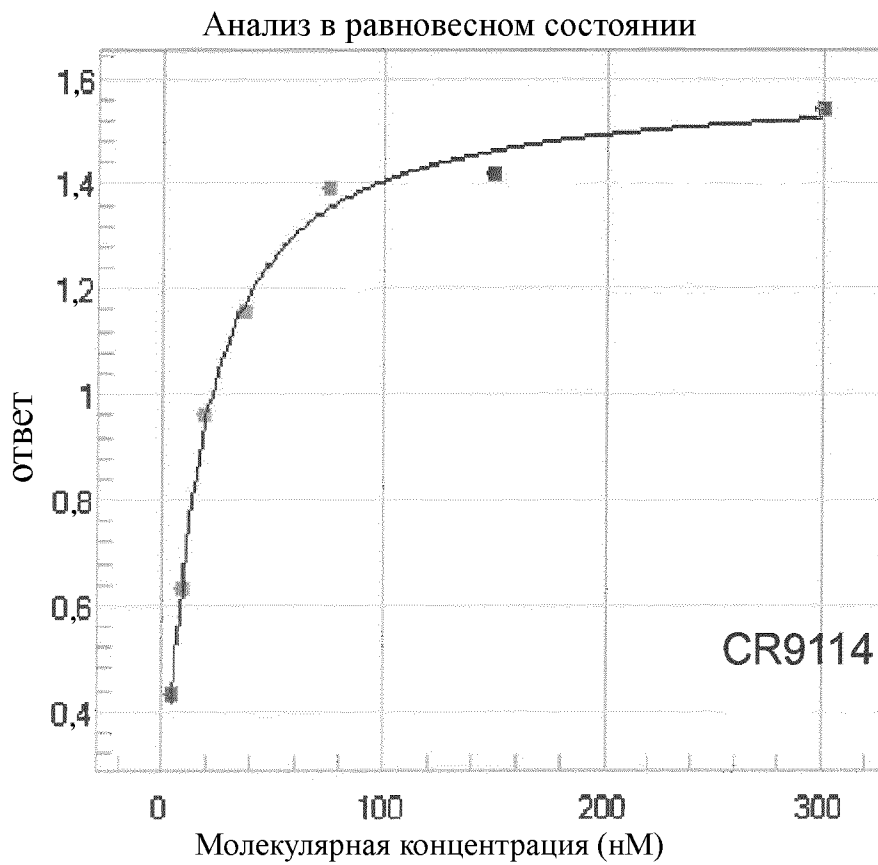
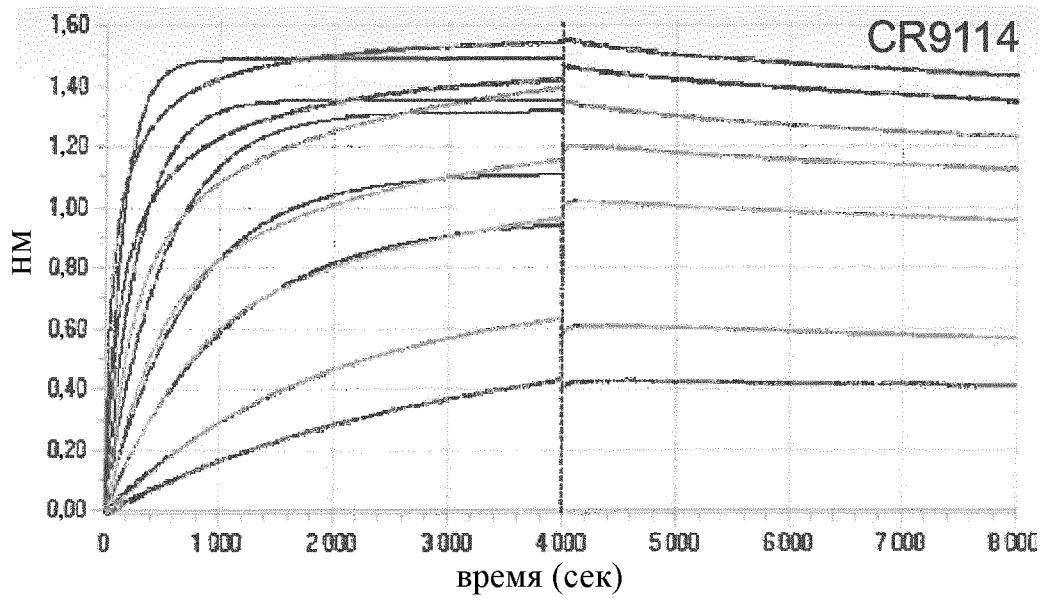


Анализ в равновесном состоянии



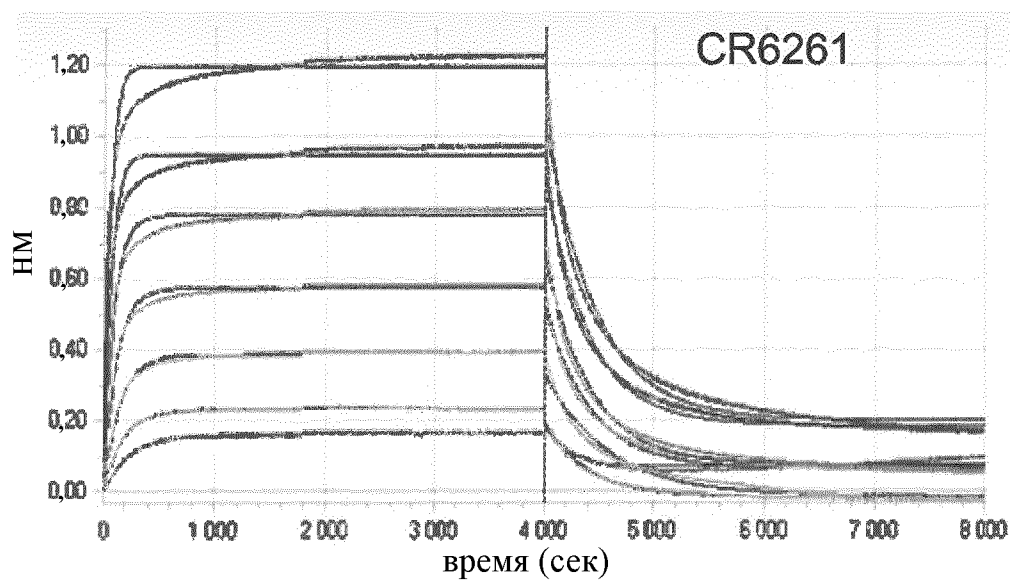
Фиг. 2В

s86B4 SEQ ID NO: 67

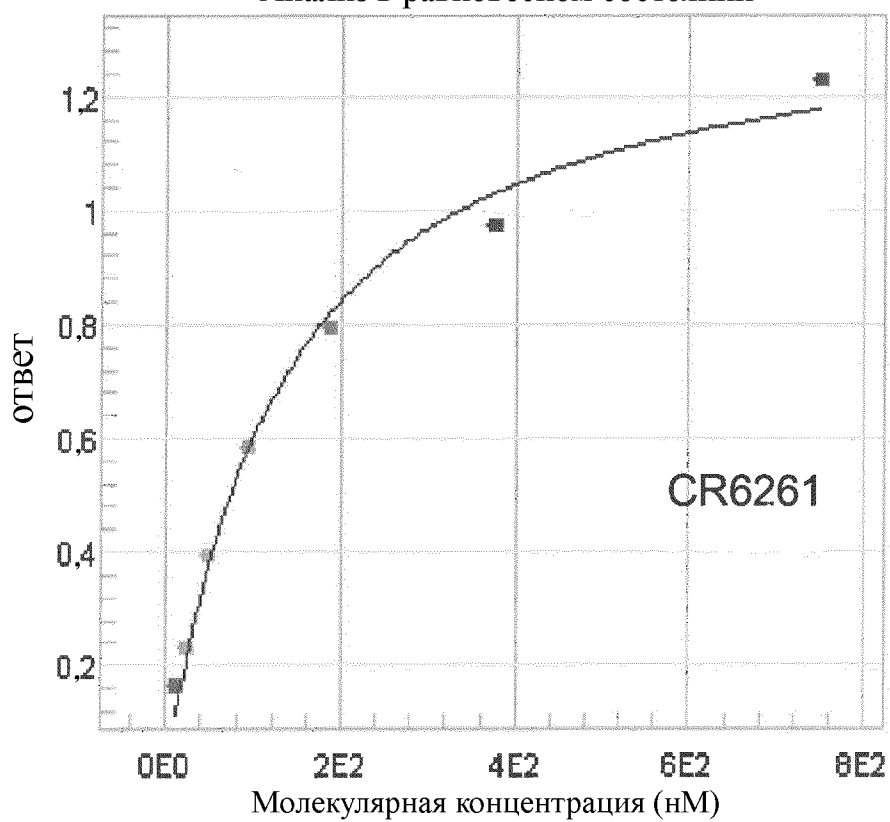


Фиг. 2В – продолжение

s86B4 SEQ ID NO: 67

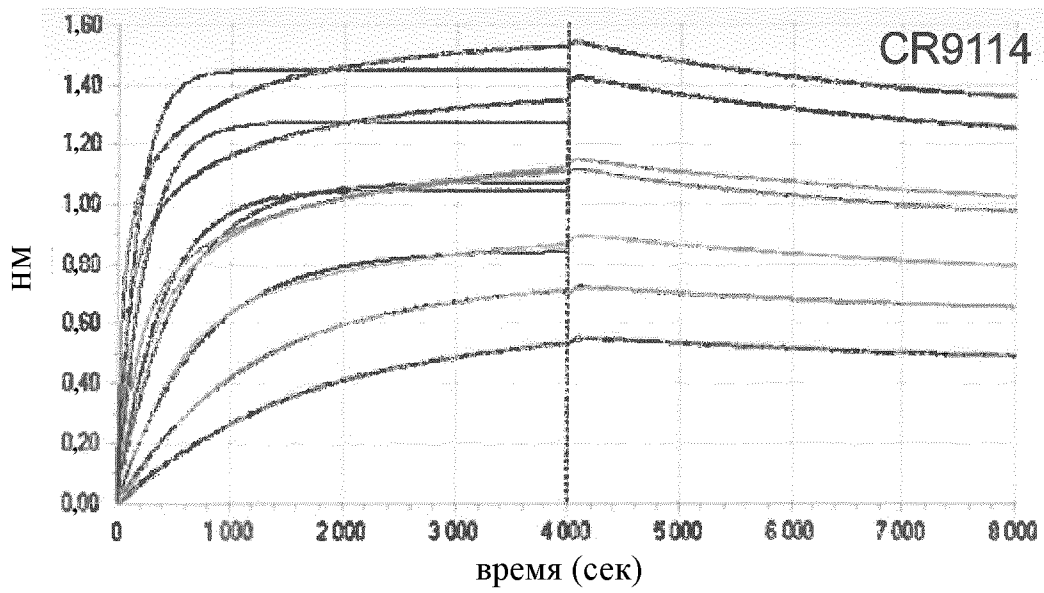


Анализ в равновесном состоянии

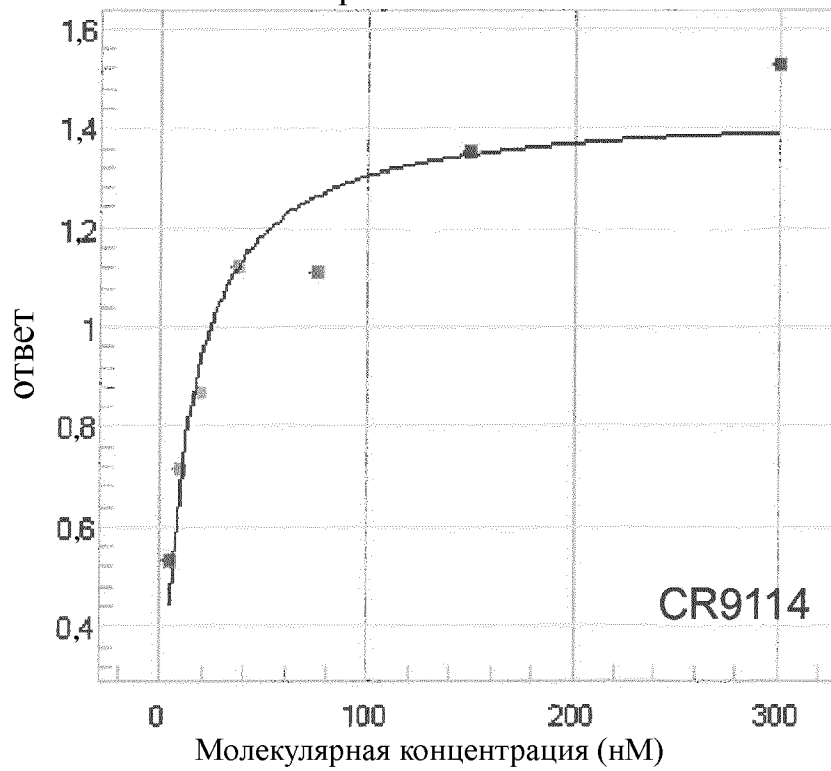


Фиг. 2С

s74H9 SEQ ID NO: 65

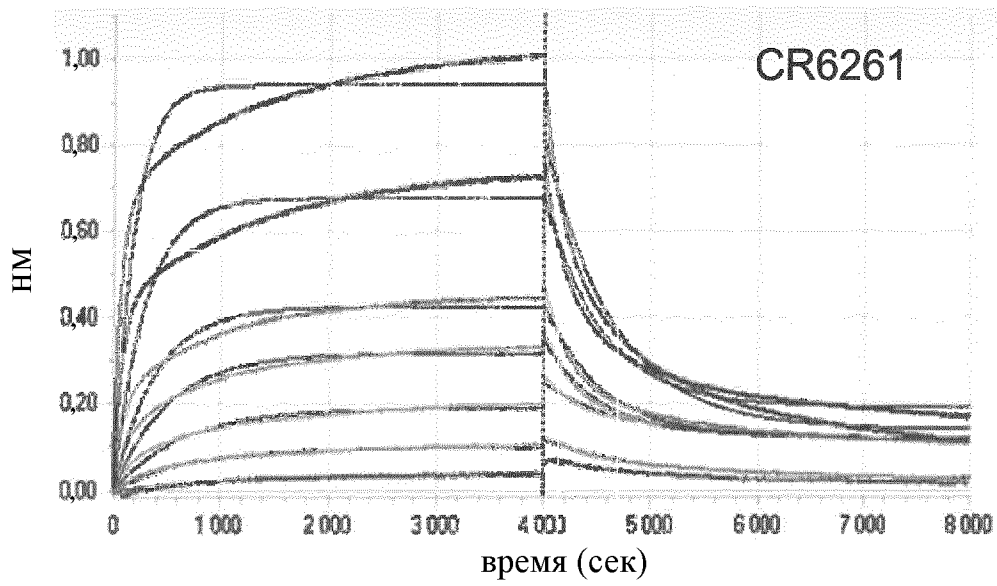


Анализ в равновесном состоянии

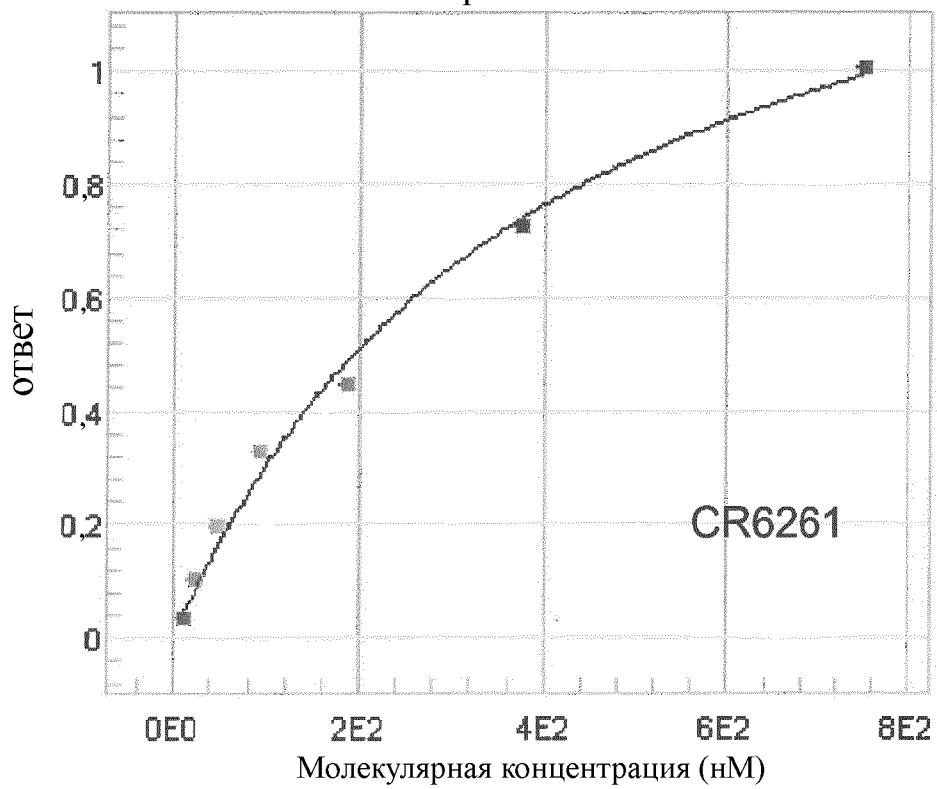


Фиг. 2С – продолжение

s74H9 SEQ ID NO: 65

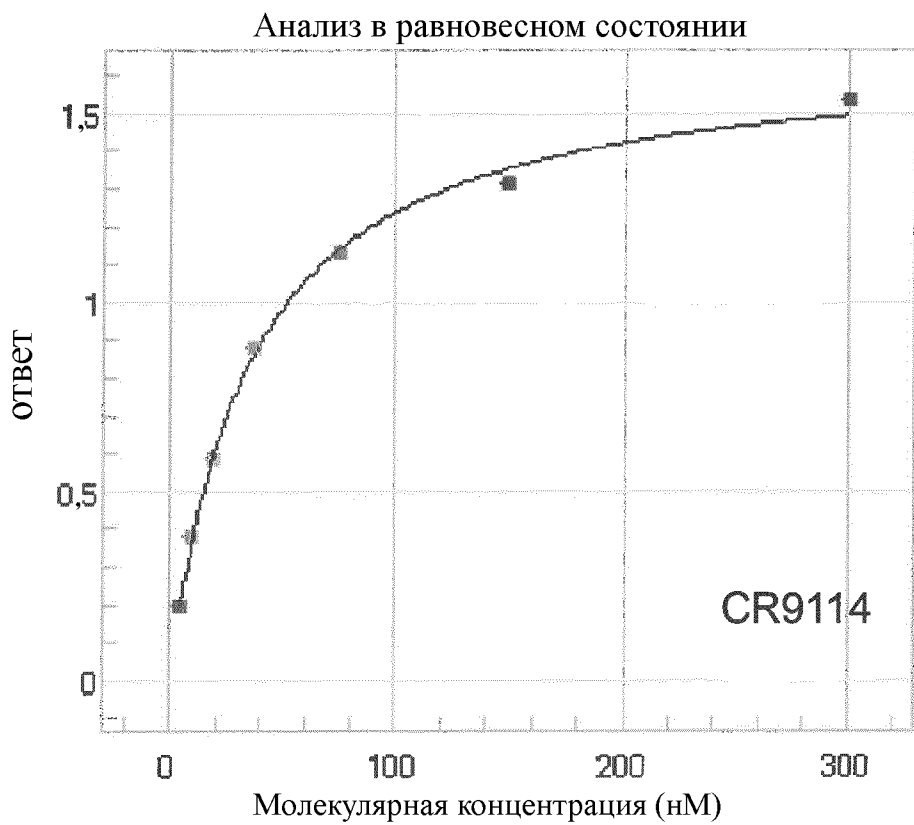
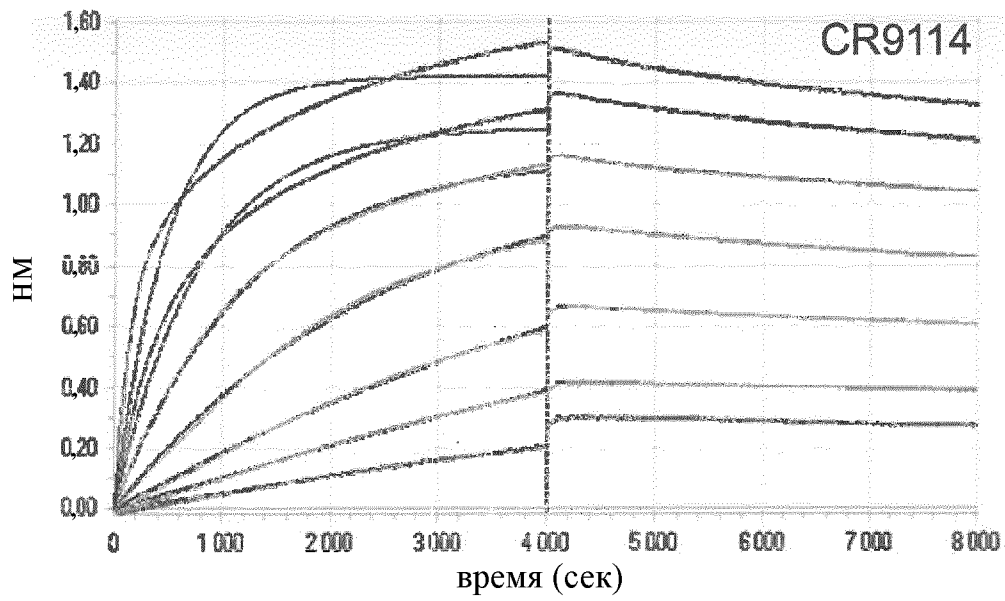


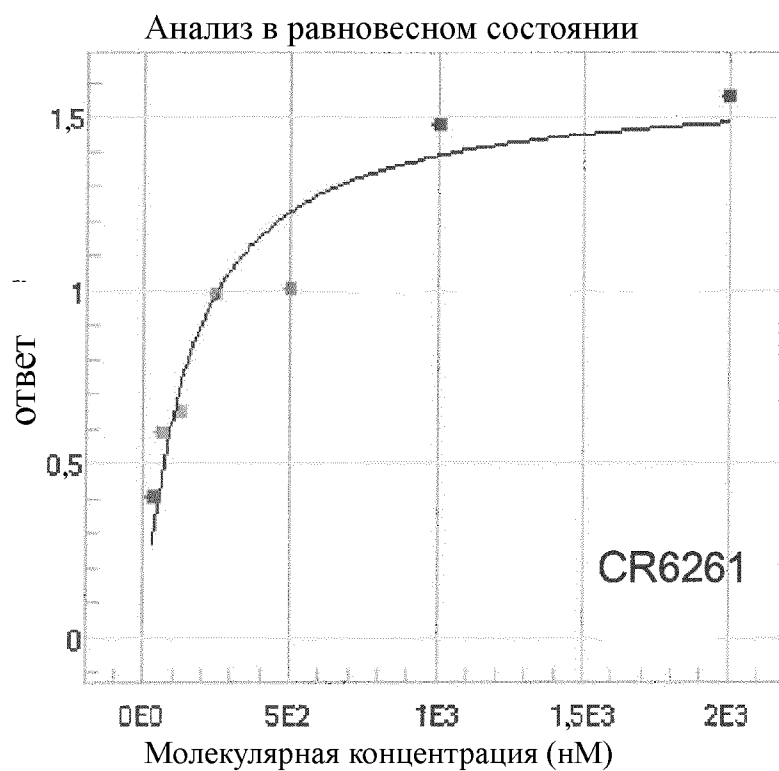
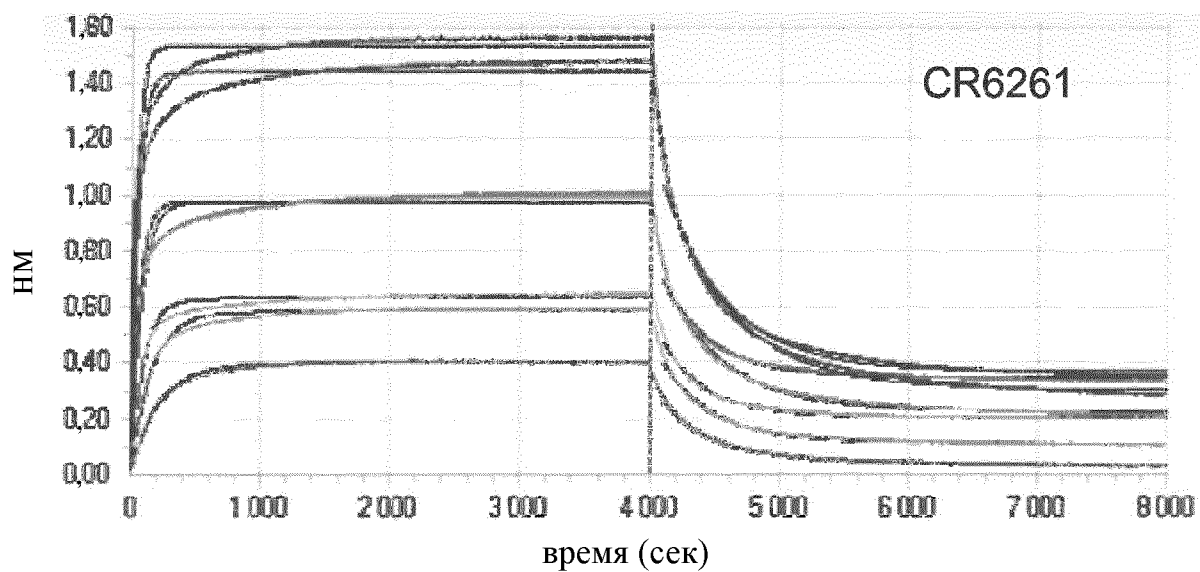
Анализ в равновесном состоянии



Фиг. 2D

s6E12 SEQ ID NO: 69

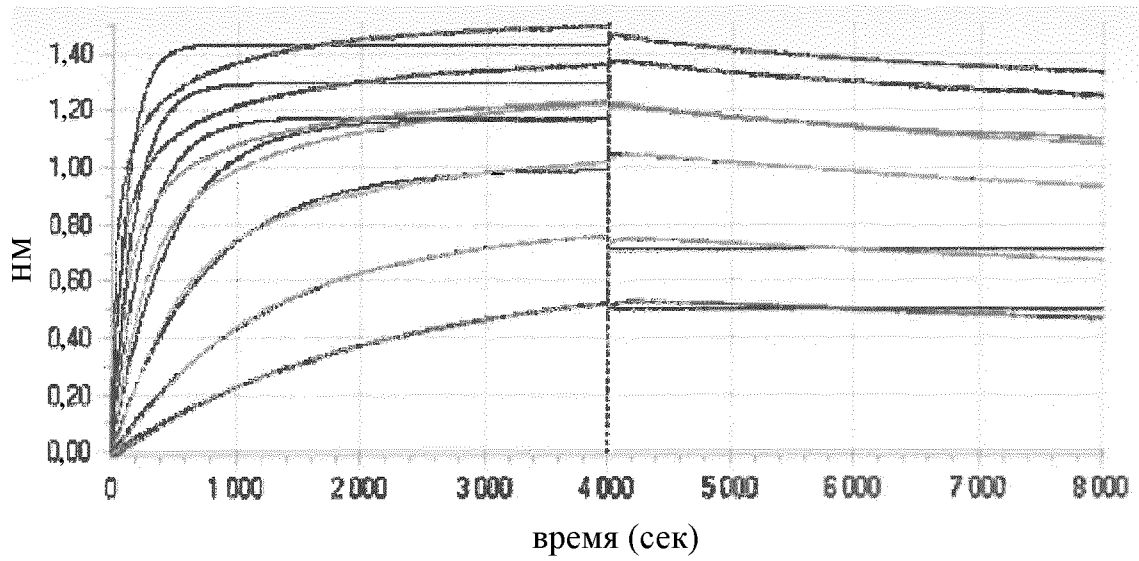




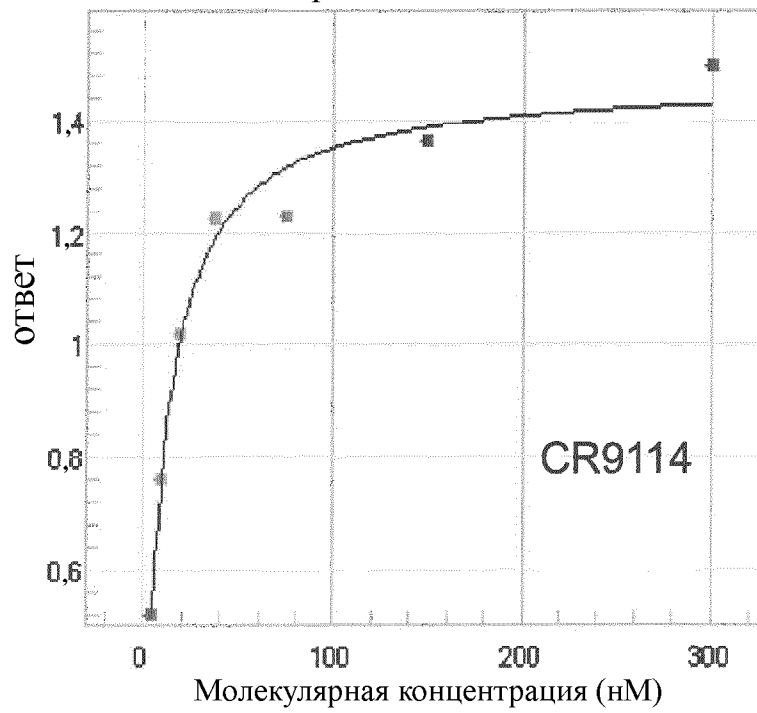
Фиг. 2E

s55G7 SEQ ID NO: 68

CR9114

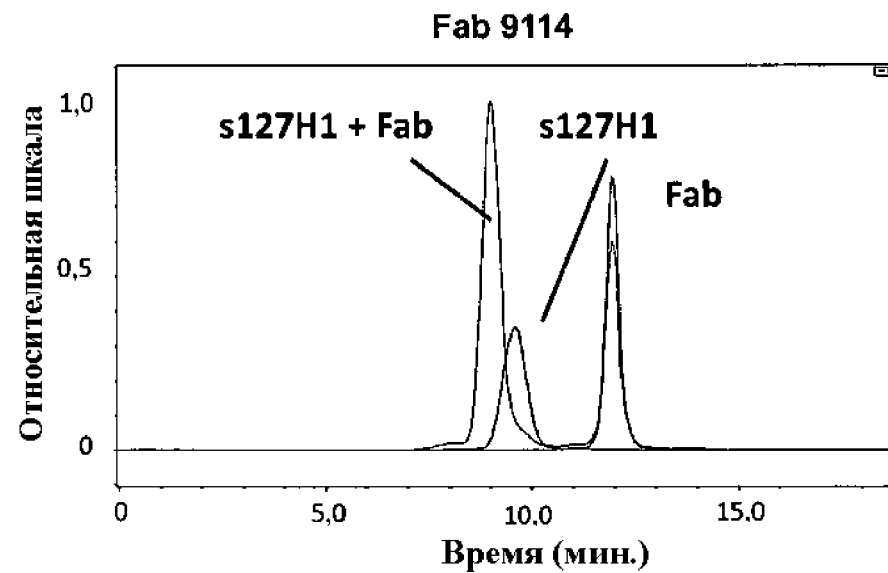
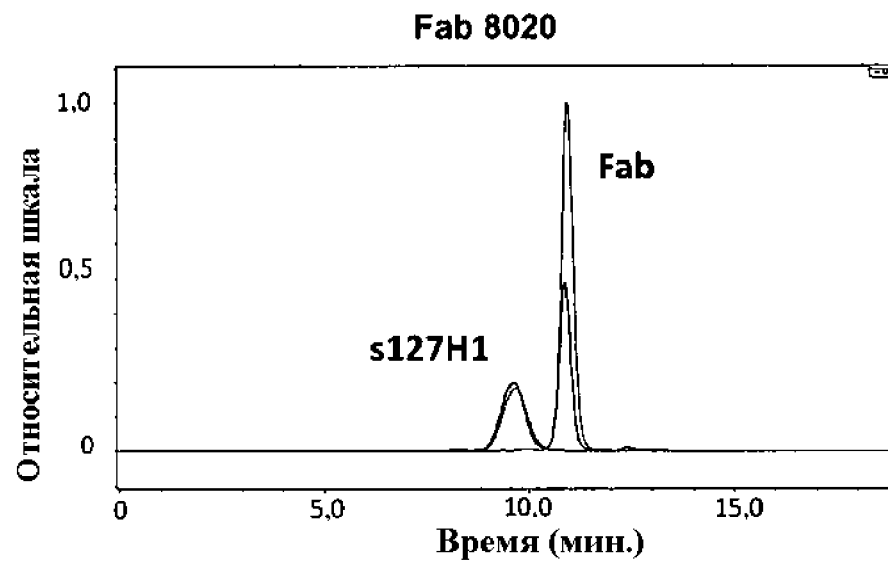
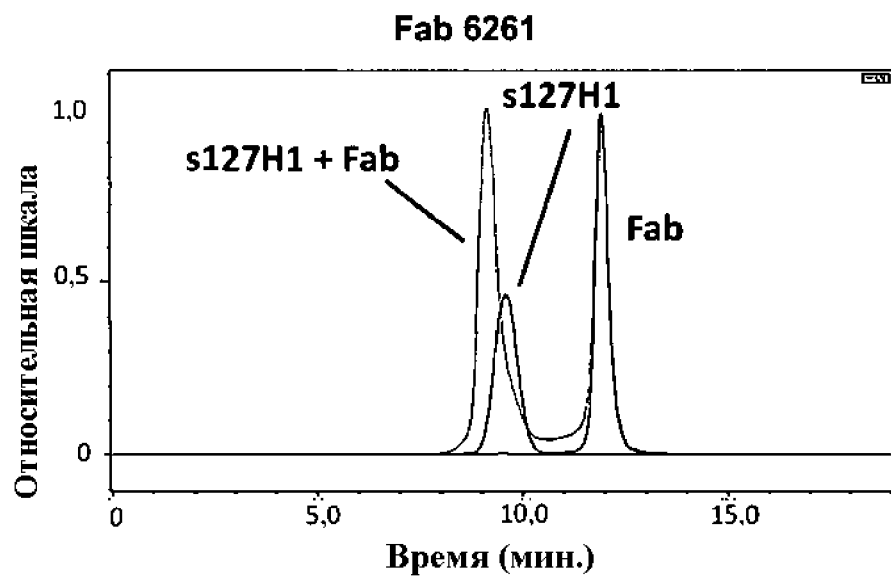


Анализ в равновесном состоянии



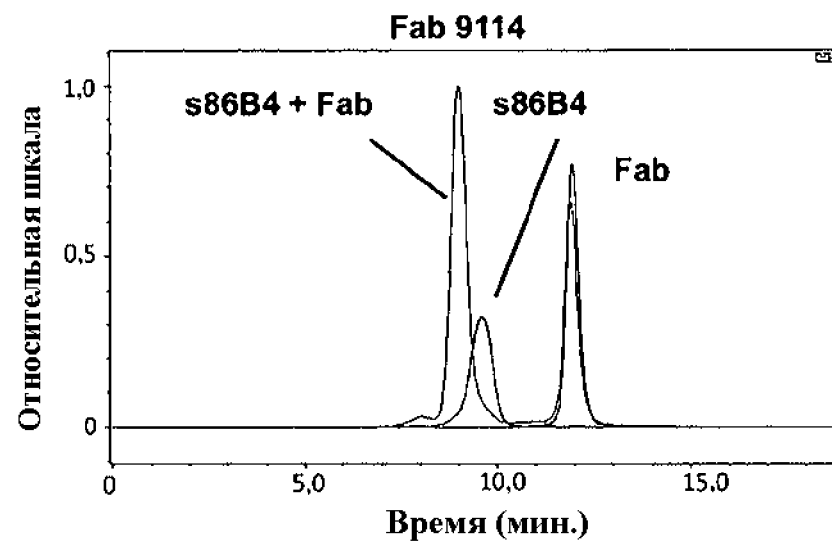
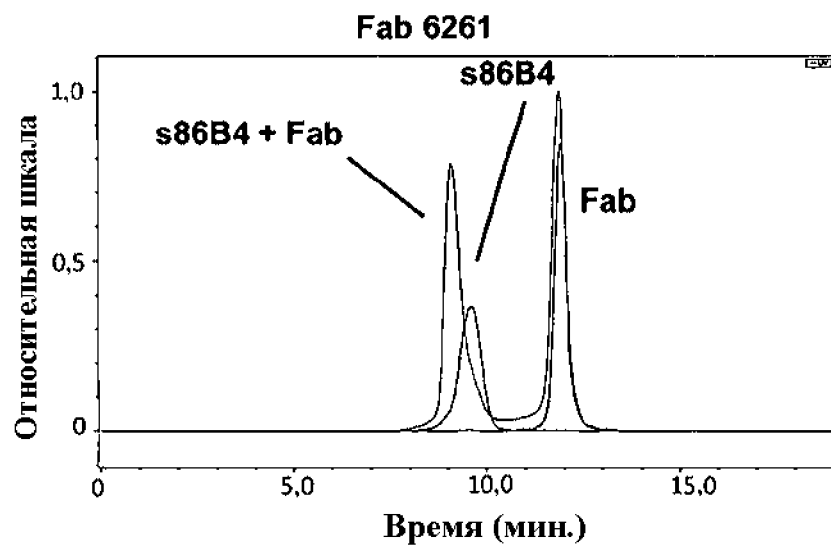
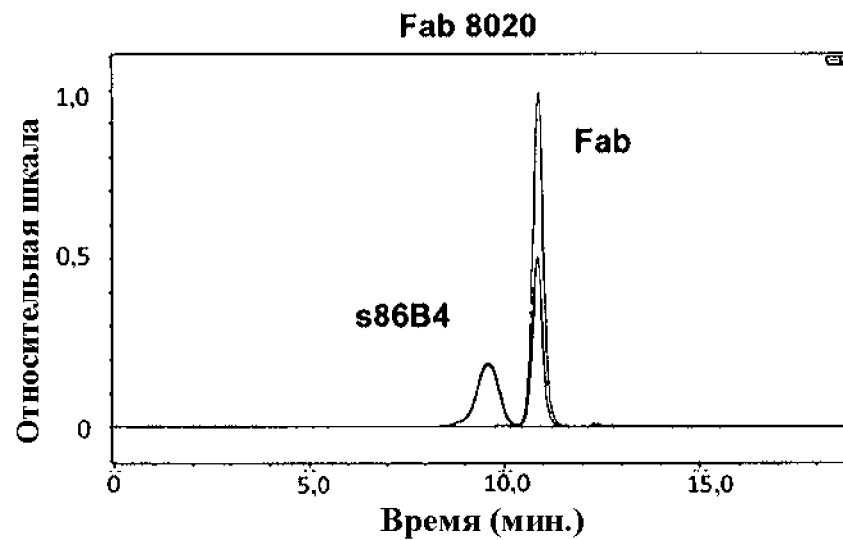
Фиг. 3А

s127H1 SEQ ID NO: 35



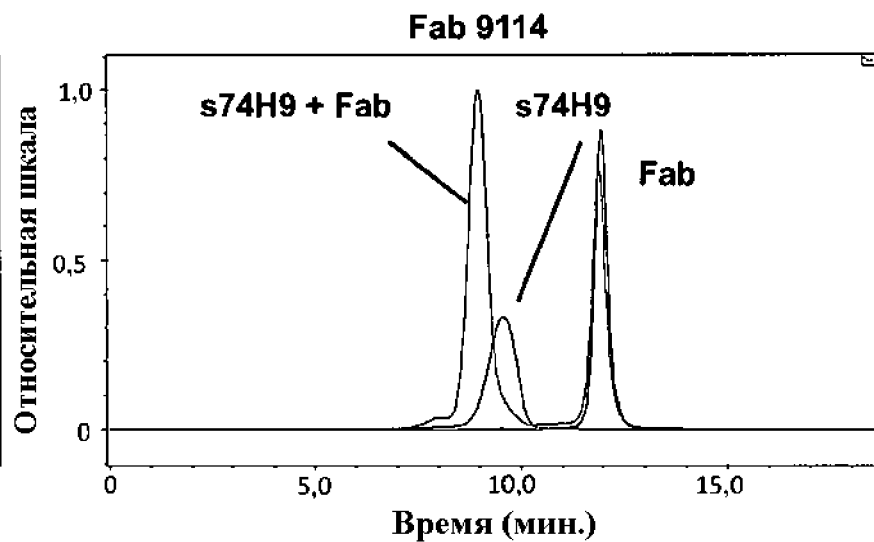
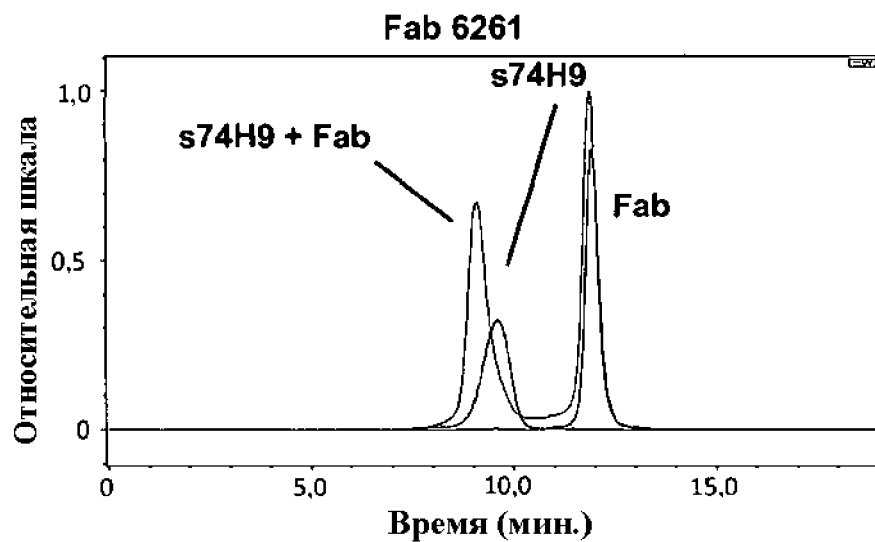
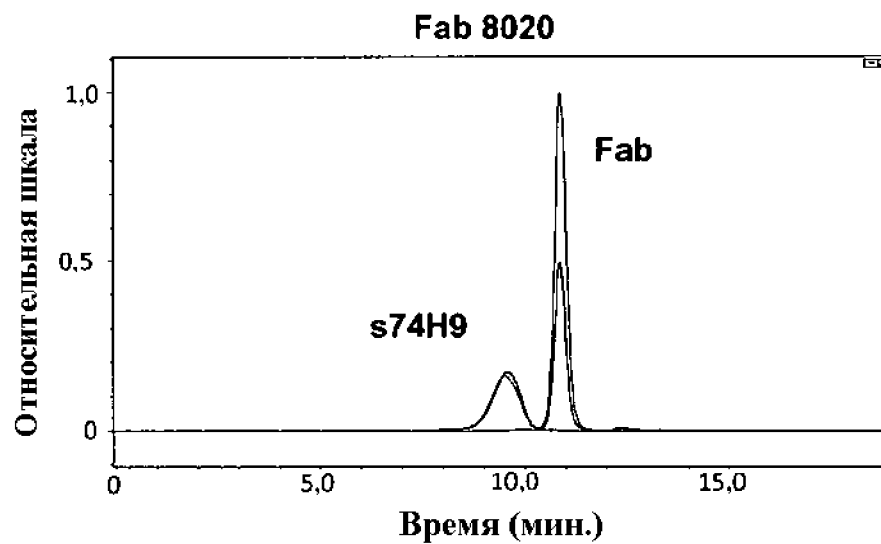
Фиг. 3В

s86B4 SEQ ID NO: 36



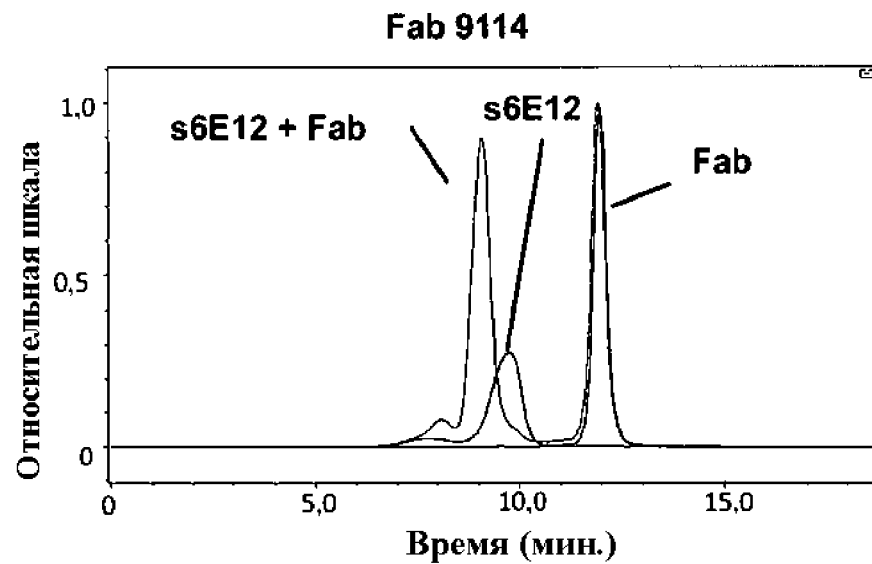
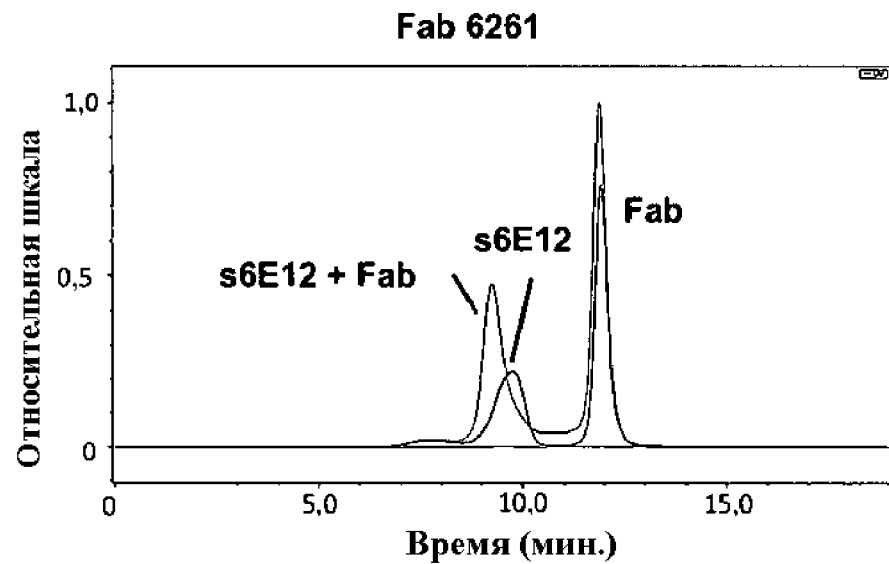
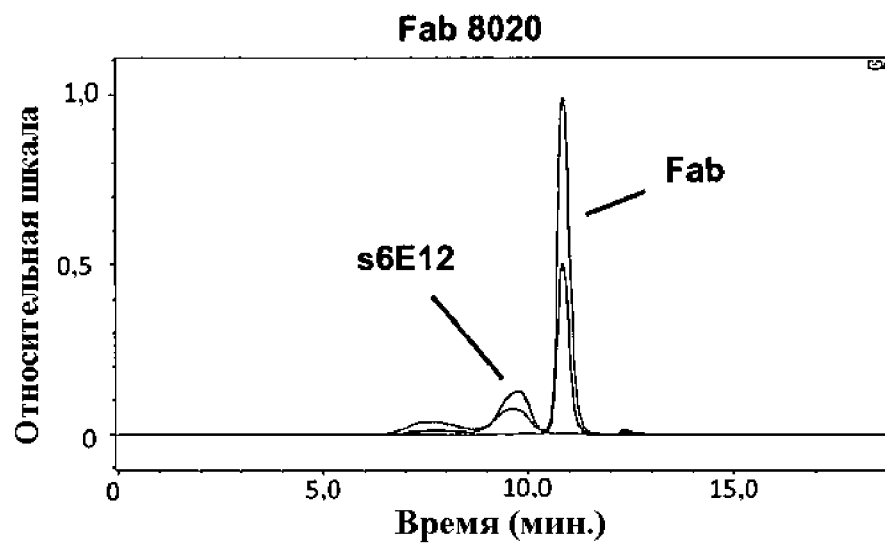
Фиг. 3С

s74H9 SEQ ID NO: 34

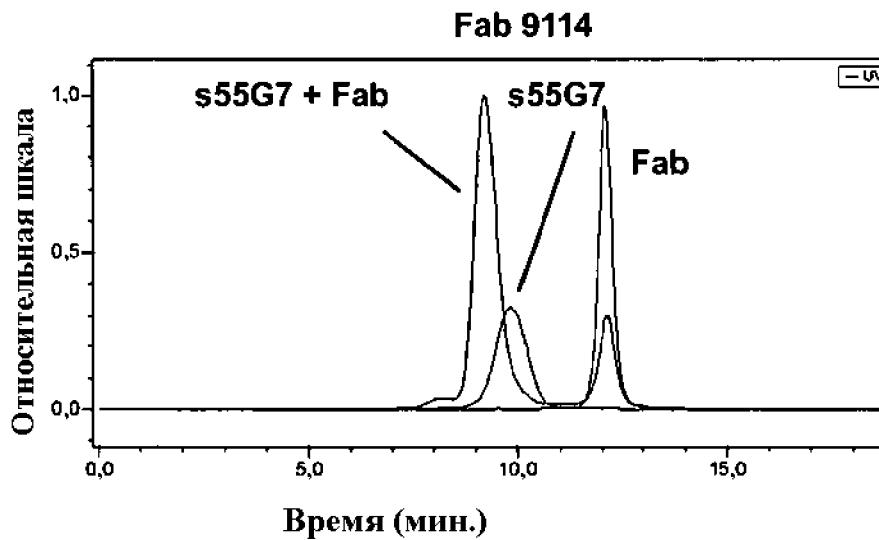
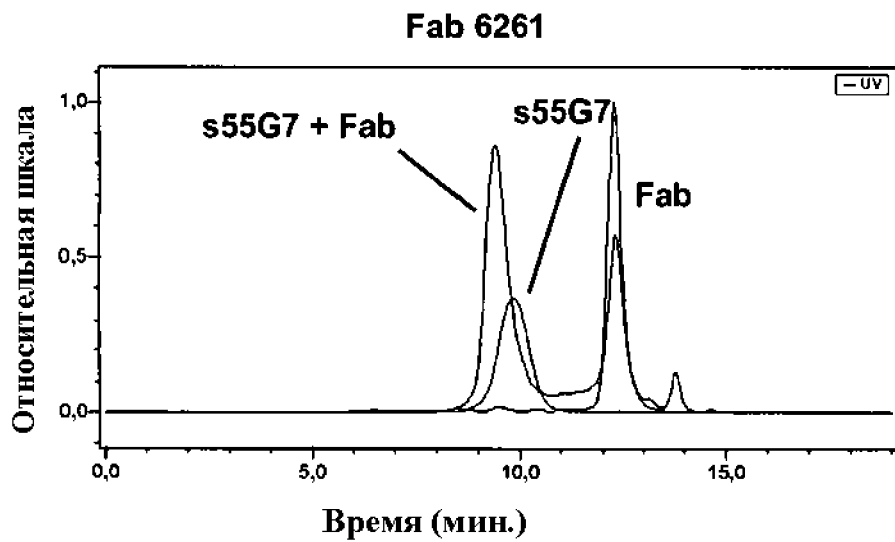
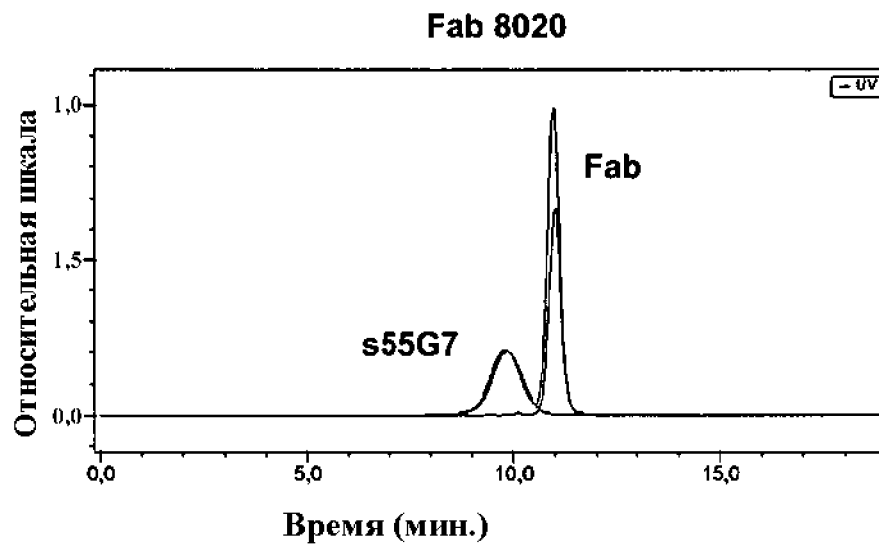


Фиг. 3D

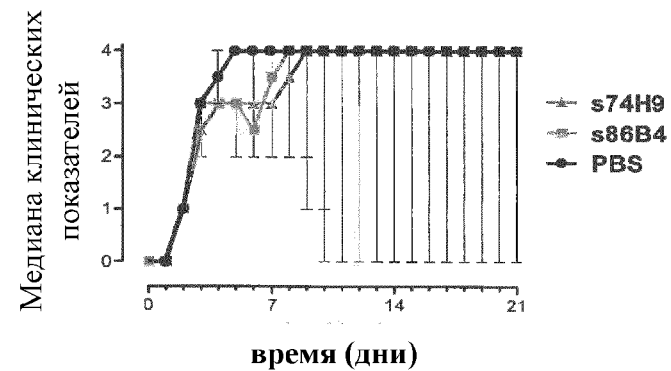
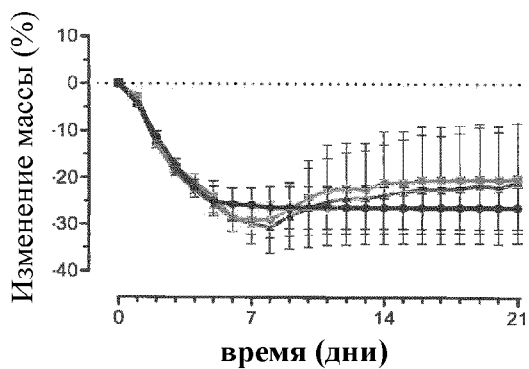
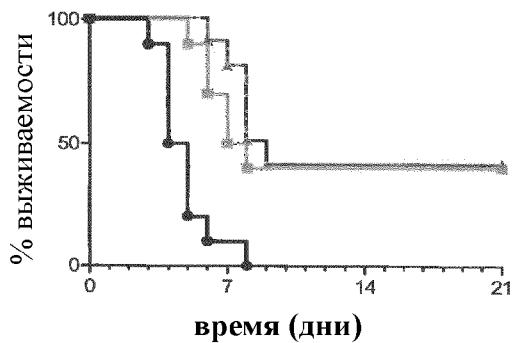
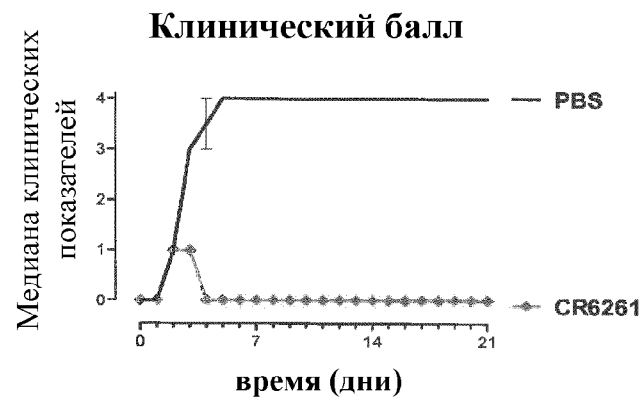
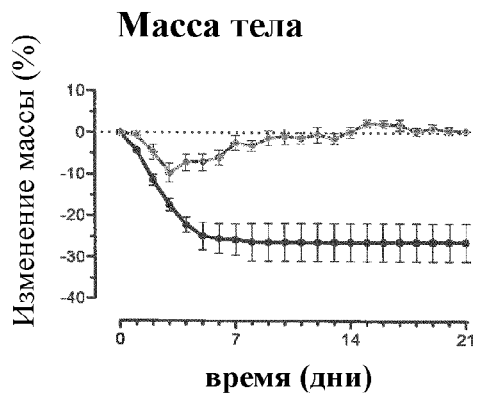
s6E12 SEQ ID NO: 38



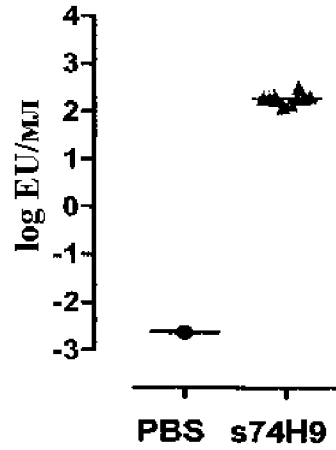
s55G7 SEQ ID NO: 37



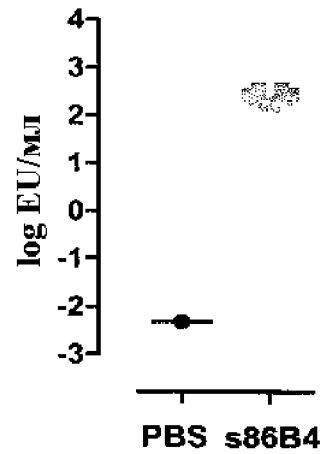
Фиг. 4А



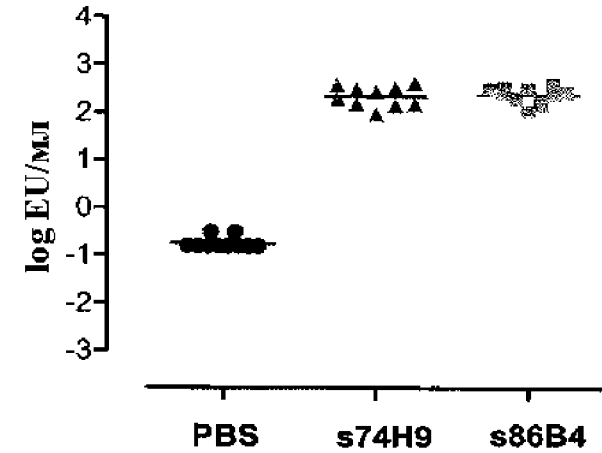
Антиген ELISA
s74H9



s86B4

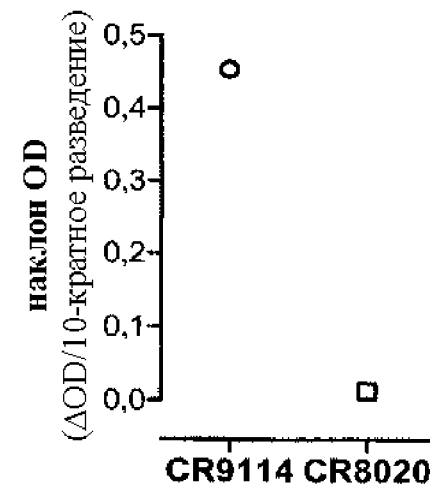
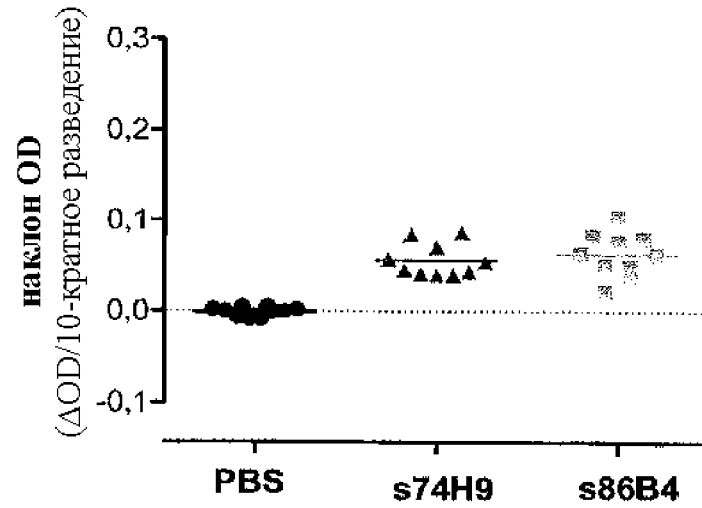


Полноразмерный HA
H1N1 A/Brisbane/59/07

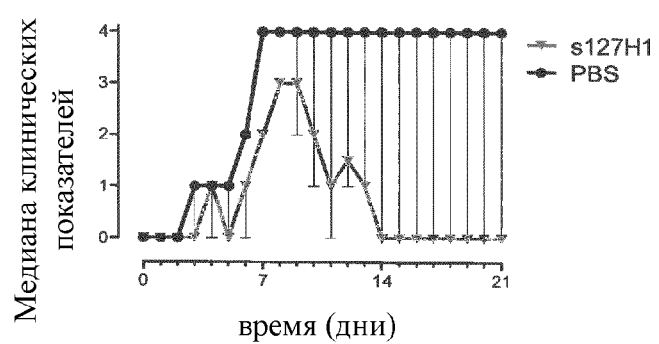
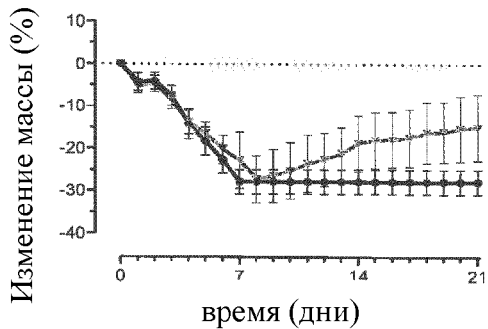
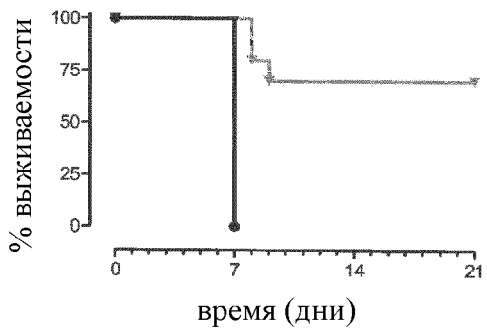
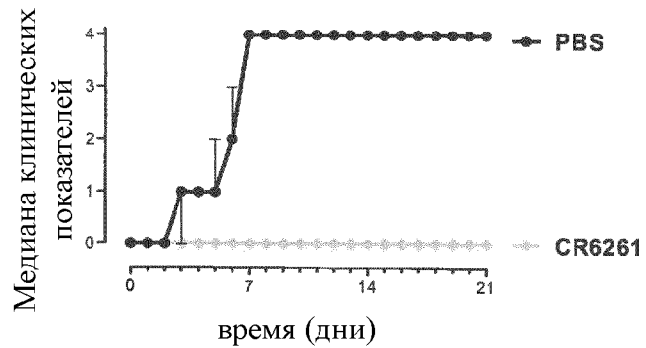
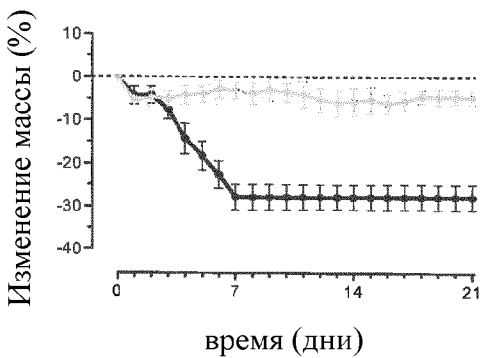
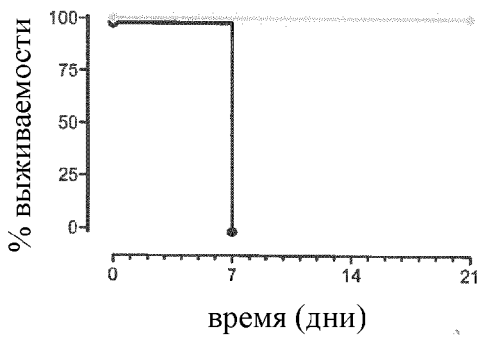


Фиг. 4B

Конкурентный ELISA с CR9114

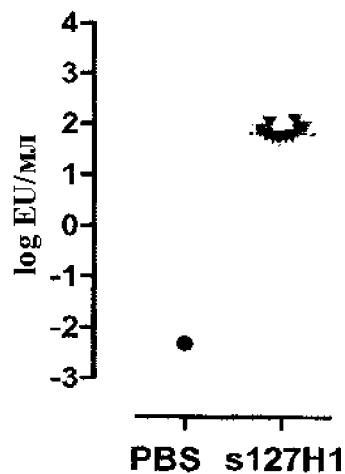


Фиг. 5А

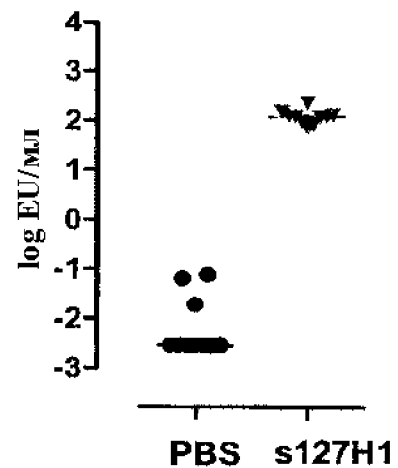


Антиген ELISA

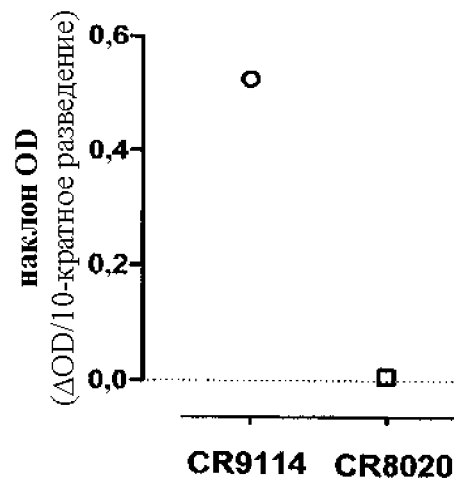
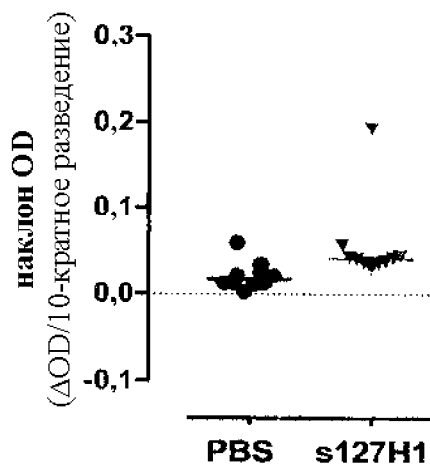
s127H1



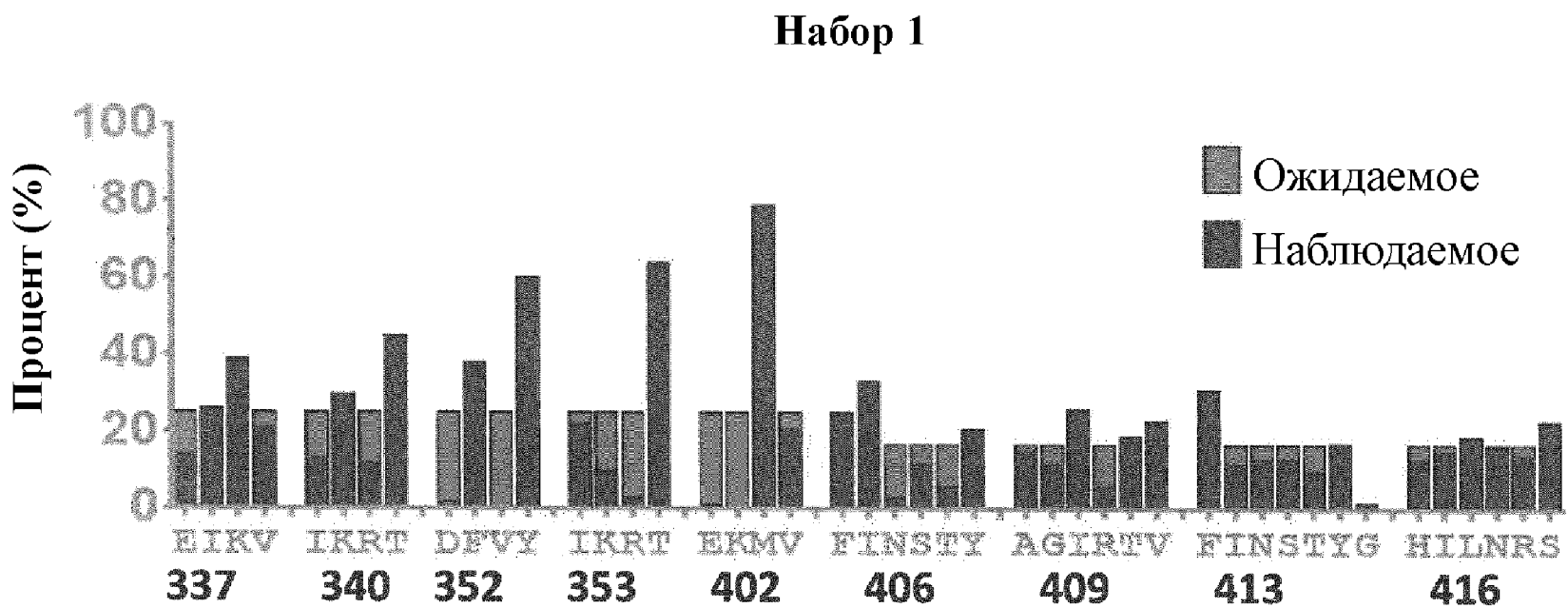
Полноразмерный HA
H1N1 A/Brisbane/59/07



Конкурентный ELISA с CR9114



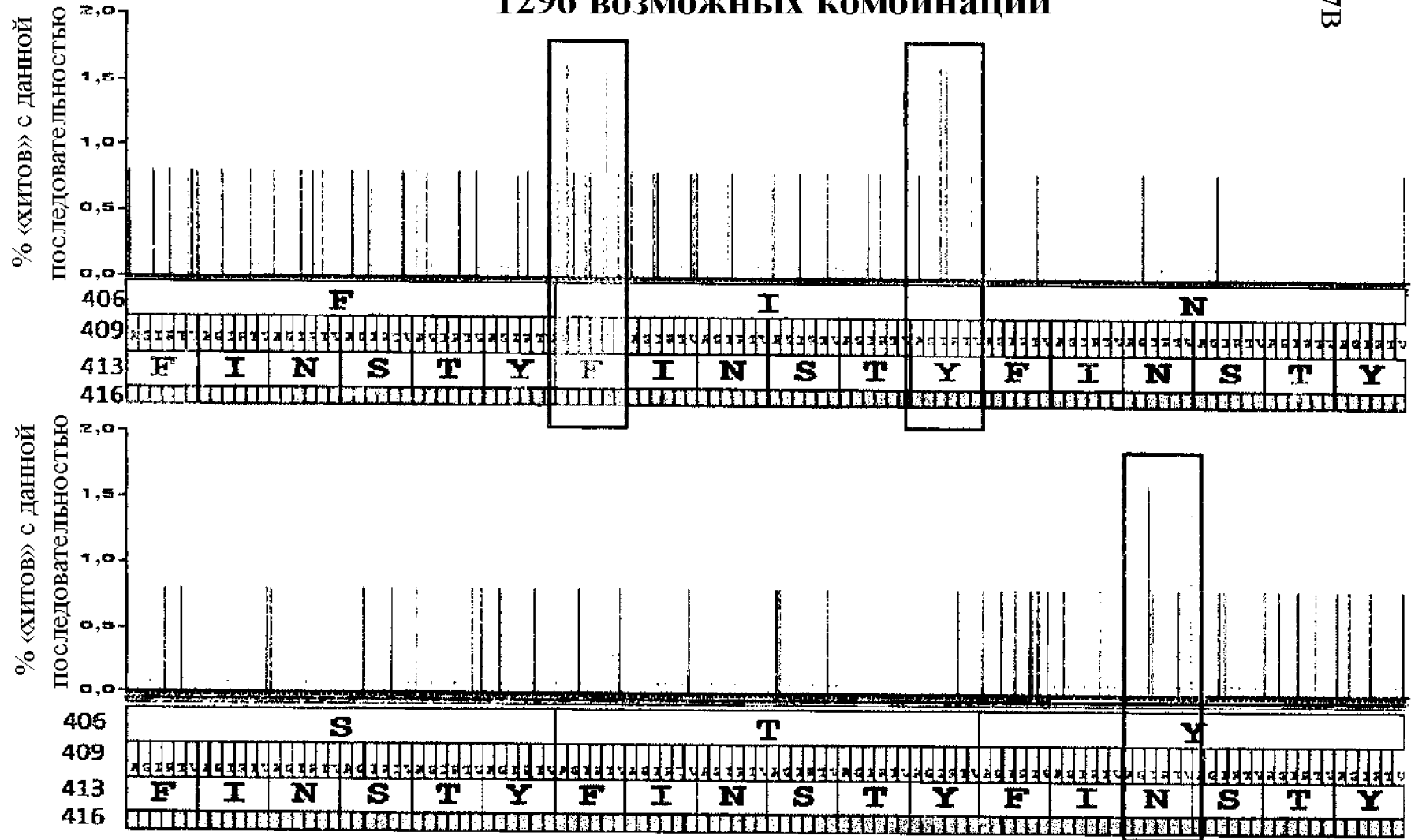
Фиг. 6



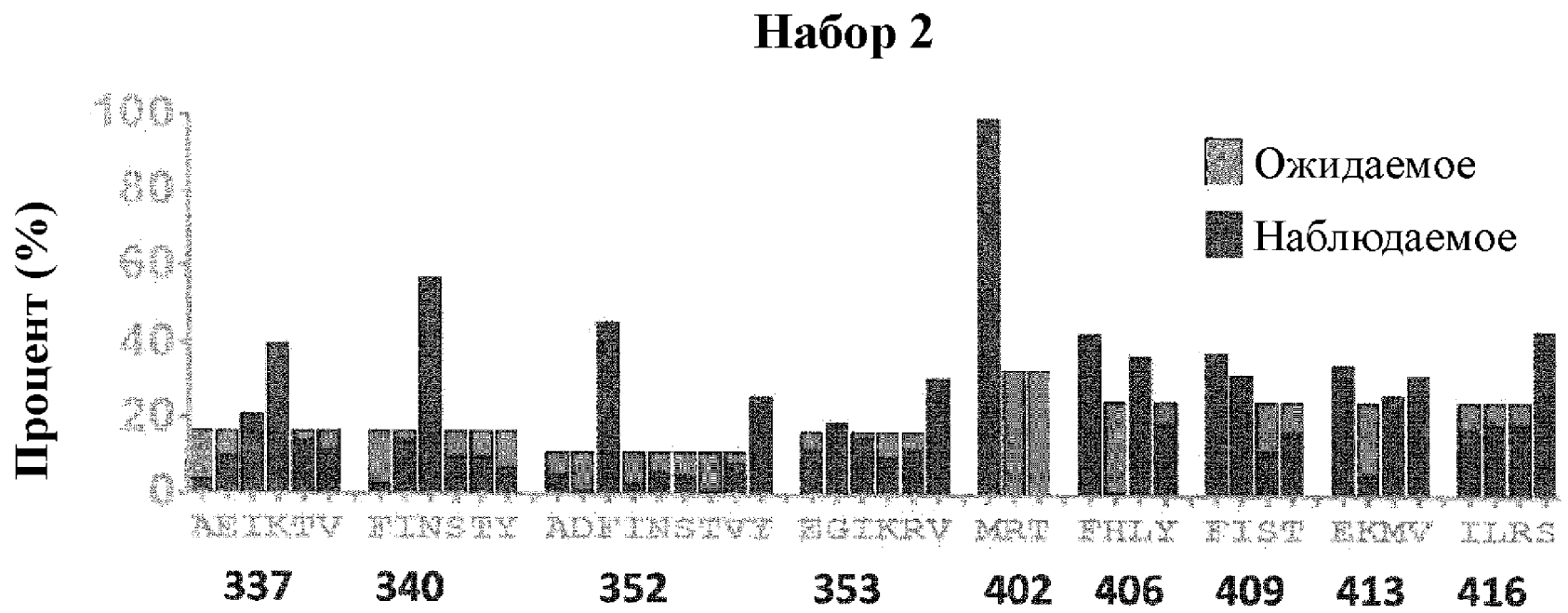
Набор 1 Область В-петли

1296 ВОЗМОЖНЫХ КОМБИНАЦИЙ

Фиг. 7В



Фиг. 8



Фиг. 9В

Набор 2 — Область В-петли
 256 возможных комбинаций

