

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044592**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.13

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)

(21) Номер заявки
201892385

(22) Дата подачи заявки
2017.06.02

(54) МОДИФИКАЦИЯ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

(31) 62/345,502

(32) 2016.06.03

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/US2017/035738

(87) WO 2017/210592 2017.12.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ ПАСТЕР ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Страгнелл Тод, Олу Элиуд, Оомен
Рэймонд (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) DONALD M. CARTER ET AL.: "Design and Characterization of a Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Vaccine for H1N1 Influenza Viruses", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 90, № 9, 24 February 2016 (2016-02-24), p. 4720-4734, XP055402472, US, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.03152-15, abstract, p. 4724, left-hand column, lines 3-4, table 1

SUN XIANGJIE ET AL.: "N-Linked Glycosylation of the Hemagglutinin Protein Influences Virulence and Antigenicity of the 1918 Pandemic and Seasonal H1N1 Influenza A Viruses", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 87, № 15, 1 August 2013 (2013-08-01), p. 8756-8766, XP008166136, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00593-13 [retrieved on 2013-06-05], abstract, p. 8756, right-hand column, lines 14-17

WO-A1-2011044152

(57) Изобретение относится к области получения вакцин против гриппа. В частности, предложен способ изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида гемагглютинина (НА), включающий выявление наличия или отсутствия сайтов N-гликозилирования в области головки сконструированного полипептида НА, введение в область головки сконструированного полипептида НА одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок и введение одной или более аминокислотных замен в пределах 15 ангстремов от сайта связывания с рецептором (RBS) сконструированного полипептида НА. Предложенное изобретение позволяет получить переконструированный полипептид НА с расширенным профилем иммуногенности.

B1

044592

044592 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Изобретение испрашивает приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/345502, поданной 3 июня 2016 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Предпосылки изобретения

Грипп имеет длительную историю пандемий, эпидемий, всплесков и вспышек. Вакцины представляли собой наиболее эффективную защиту от гриппа. Однако попытки разработать и получить вакцины, которые индуцируют штаммоспецифический иммунитет, который сохраняется в течение года, затруднены, поскольку грипп продолжает вызывать значительные проблемы со здоровьем во всем мире. Действительно, представленные в настоящее время на рынке вакцины против вируса гриппа необходимо ежегодно обновлять на основе прогнозируемых штаммов, которые будут присутствовать в популяциях людей в приближающемся сезоне.

Современные вакцины против вируса гриппа основаны на индукции иммунитета к антигену, представляющему собой гемагглютинин, присутствующему на поверхности вирусов гриппа. Гемагглютинин (НА) представляет собой гликопротеин, ответственный за связывание вируса гриппа с клетками путем взаимодействия с содержащими сиаловые кислоты структурами на их мембранах. Он сильно отличается у разных штаммов вируса гриппа из-за непрерывного мутирования вируса и давления иммунитета хозяина. Изменчивость (также известная как антигенный дрейф) молекулы НА приводит к тому, что вакцина на основе полипептида НА обычно противодействует только небольшой подгруппе родственных циркулирующих вирусов. Со временем количество штаммов, к которым образуется перекрестно-реактивный иммунитет уменьшается по мере того, как вирус продолжает мутировать. Следовательно, НА-составы вакцин против вируса гриппа постоянно модифицируют, если изменение молекулы НА является таким, что существующая вакцина более не эффективна. Помимо существующих стратегий вакцинации против вируса гриппа разработка универсальной вакцины остается перспективной для увеличения широты существующих штаммоспецифических вакцин и их невосприимчивости к антигенному дрейфу. Универсальные вакцины против вируса гриппа обладают способностью защитить людей и животных от широкого диапазона типов, подтипов и штаммов вируса гриппа, включая пандемические и/или сезонные штаммы. Из уровня техники известно несколько подходов к разработке универсальных антигенов гриппа. Однако существующие подходы зачастую приводят к получению полипептида НА, который по-прежнему оказывает влияние в отношении сезонных или пандемических штаммов.

Краткое описание изобретения

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА, включающие стадии выявления наличия или отсутствия одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования в области головки сконструированного полипептида НА по сравнению с соответствующей областью головки полипептида НА с отличным профилем иммуногенности; введение в область головки сконструированного полипептида НА одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования или встраивания дополнительных сайтов N-гликозилирования исходя из соответствующей последовательности полипептида НА с отличным профилем иммуногенности, за счет чего обеспечивается получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления один или более предполагаемых или дополнительных сайтов N-гликозилирования определяются консенсусной последовательностью NxS/Ty, где x и y не представляют собой P. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид НА характеризуется преимущественно сезонным иммунным профилем, а полипептид НА с отличным профилем иммуногенности характеризуется преимущественно пандемическим иммунным профилем, при этом в сконструированный полипептид НА введена одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования, и при этом переконструированный полипептид НА изменен таким образом, чтобы он в большей степени соответствовал пандемическому. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид НА характеризуется преимущественно пандемическим иммунным профилем, а полипептид НА с отличным профилем иммуногенности характеризуется преимущественно сезонным иммунным профилем, при этом в сконструированный полипептид НА введена одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок для вставки одного или более предполагаемых дополнительных сайтов N-гликозилирования, и при этом переконструированный полипептид НА изменен таким образом, чтобы он в большей степени соответствовал сезонному.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА, включающие введение одной или более аминокислотных замен в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5 и т.д.) ангстремов от сайта связывания с рецептором (RBS), при этом RBS определен как все аминокислотные остатки в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6 или 5) ангстремов от положения, соответствующего остатку W167 (согласно нумерации CA09) в трехмерной (3D) структуре; где каждая из одной или более аминокислотных замен предусматривает замещение аминокислотного остатка в конкретном положении аминокислотных

кислотным остатком, наблюдаемым в соответствующем положении в полипептиде НА с отличным профилем иммуногенности, за счет чего обеспечивается получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности. В качестве альтернативы, RBS можно определить как эпитоп, связываемый паратопом моноклонального антитела СН65, и при этом одна или более аминокислотных замен присутствуют рядом с (например, в пределах 100 аминокислотных остатков, в пределах 75 аминокислотных остатков, в пределах 50 аминокислотных остатков, в пределах 40 аминокислотных остатков, в пределах 30 аминокислотных остатков, в пределах 25 аминокислотных остатков, в пределах 20 аминокислотных остатков, в пределах 15 аминокислотных остатков, в пределах 10 аминокислотных остатков, в пределах 5 аминокислотных остатков и т.д.) эпитопом СН65. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с отличным профилем иммуногенности получен из циркулирующего сезонного или пандемического штамма вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид НА характеризуется преимущественно сезонным иммунным профилем, а полипептид НА с отличным профилем иммуногенности характеризуется преимущественно пандемическим иммунным профилем, и при этом переконструированный полипептид НА изменен таким образом, чтобы он в большей степени соответствовал пандемическому. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид НА характеризуется преимущественно пандемическим иммунным профилем, а полипептид НА с отличным профилем иммуногенности характеризуется преимущественно сезонным иммунным профилем, и при этом переконструированный полипептид НА изменен таким образом, чтобы он в большей степени соответствовал сезонному.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА, включающие введение одной или более модификаций, выбранных из тех, которые показаны в табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9, в одно или более соответствующих положений сконструированного полипептида НА, за счет чего обеспечивается получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций присутствуют в положениях, соответствующих 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213, 214, 244, 245 и/или 262 сконструированного полипептида НА (согласно нумерации СА09). В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций присутствуют в положениях, соответствующих 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213 и/или 214 сконструированного полипептида НА (согласно нумерации СА09). В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций предусматривают две или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, или десять или более модификаций, выбранных из тех, которые показаны в табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций предусматривают по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 10 последовательных замен, выбранных из табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА, включающие выбор двух или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из следующего:

(i) выбора области головки сконструированного полипептида НА и замены выбранной областью головки сконструированного полипептида НА соответствующей области головки полипептида НА с отличным профилем иммуногенности;

(ii) выявления наличия или отсутствия одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования в области головки сконструированного полипептида НА по сравнению с соответствующей областью головки полипептида НА с отличным профилем иммуногенности и введения в область головки сконструированного полипептида НА одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования или встраивания дополнительных сайтов N-гликозилирования в сконструированный полипептид НА исходя из соответствующей последовательности полипептида НА с отличным профилем иммуногенности;

(iii) введения одной или более аминокислотных замен в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6 или 5) ангстремов от сайта связывания с рецептором (RBS), при этом RBS определен как все аминокислотные остатки в пределах 15 ангстремов от положения, соответствующего W167 (согласно нумерации СА09) в трехмерной (3D) структуре; где каждая из одной или более аминокислотных замен предусматривает замещение аминокислотного остатка в конкретном положении аминокислотным остатком, наблюдаемым в соответствующем положении в полипептиде НА с отличным профилем иммуногенности; в качестве альтернативы, RBS можно определить как эпитоп, связываемый паратопом моноклонального антитела СН65, и при этом одна или более аминокислотных замен присутствуют рядом с (например, в пределах 100 аминокислотных остатков, в пределах 75 аминокислотных остатков, в пределах 50 аминокислотных остатков, в пределах 40 аминокислотных остатков, в пределах 30 аминокислотных остатков, в пределах 25 аминокислотных остатков, в пределах 20 аминокислотных остатков, в пределах 15 аминокислотных остатков, в пределах 10 аминокислотных остатков, в пределах 5 аминокислотных остатков и т.д.) эпитопом СН65; и

(iv) введения одной или более модификаций, выбранных из тех, которые показаны в табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9, в одно или более соответствующих положений сконструированного полипептида НА,

за счет чего обеспечивается получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности.

В различных вариантах осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включает оценку экспрессии и конформации переконструированного полипептида НА.

В различных вариантах осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включает стадию определения того, обеспечивает ли переконструированный полипептид НА выработку нейтрализующих антител против сезонных и/или пандемических штаммов вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности включает увеличение показателя связывания для одного или более моноклональных антител к области головки в отношении сезонных и/или пандемических штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности предусматривает увеличение спектра связывания для моноклональных антител к области головки в отношении пандемических штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности включает увеличение спектра связывания для моноклональных антител к стеблевой области. В таких вариантах осуществления модификации в области головки индуцируют увеличение связывания с моноклональными антителами к стеблевой области, что свидетельствует о том, что замены в одном месте могут оказывать далекодействующие аллостерические эффекты на отдаленном местоположении. В некоторых вариантах осуществления увеличение показателей связывания определяют посредством детекции с помощью проточной цитометрии моноклональных антител, связанных с переконструированными полипептидами НА, экспрессируемыми на поверхности клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления уровень моноклональных антител, которые связываются с переконструированными полипептидами НА, экспрессируемыми на поверхности клеток млекопитающих, определяют количественно.

В изобретении использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Как используется в изобретении, термин "содержать" и вариации данного термина, такие как "содержащий" и "содержит", не исключают другие добавки, компоненты, целые числа или стадии. Как используется в изобретении термины "приблизительно" и "примерно" используются как равнозначные. Подразумевается, что любые числительные, используемые в изобретении с термином "приблизительно/примерно" или без него, охватывают любые обычные отклонения, что понятно среднему специалисту в данной области техники.

Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения очевидны из приведенных далее подробного описания, графических материалов и формулы изобретения. Однако следует понимать, что подробное описание, графические материалы и формула изобретения, хотя в них указаны варианты осуществления настоящего изобретения, приведены лишь с целью иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники.

Краткое описание графических материалов

Графические материалы приведены лишь в целях иллюстрации, а не для ограничения.

На фиг. 1 показаны три различные области, различающиеся конкретными сайтами остатков, по которым была усечена глобулярная головка.

На фиг. 2 показана схема анализа на основе проточной цитометрии, применяемого для демонстрации надлежащей укладки, экспрессии и способностей связывания антителом полипептидов НА вируса гриппа.

На фиг. 3 показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии, демонстрирующие надлежащую укладку и экспрессию рекомбинантных полипептидов НА, полученных путем прививания областей глобулярной головки RBS гриппа на реципиентные стеблевые области НА.

На фиг. 4 показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии, демонстрирующие улучшенный сезонный иммунный профиль (что демонстрируется повышенным связыванием mAb) рекомбинантных полипептидов НА, полученных путем прививания областей глобулярной головки RBS гриппа на реципиентные стеблевые области НА.

На фиг. 5 показано цифровое представление увеличенного спектра иммунологической активности рекомбинантных полипептидов НА, полученных путем прививания областей глобулярной головки RBS гриппа на реципиентные стеблевые области НА.

На фиг. 6 показано графическое представление предполагаемых сайтов N-гликозилирования, сайтов вставки в петлю лизина и модификации остатков вокруг сайта RBS.

На фиг. 7 показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии, демонстрирующие надлежащую укладку и экспрессию рекомбинантных полипептидов НА, полученных посредством модификаций предполагаемых сайтов N-гликозилирования, вставок в петлю лизина или аминокислотных остатков в области глобулярной головки.

На фиг. 8 показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии, демонстрирующие увеличенный спектр иммунологической активности рекомбинантных полипептидов НА, полученных посредством модификаций предполагаемых сайтов N-гликозилирования, вставок в петлю лизина или ами-

нокислотных остатков в области глобулярной головки.

На фиг. 9 показано графическое представление аминокислотных остатков в области глобулярной головки, которые можно модифицировать для изменения спектра иммунологической активности рекомбинантного полипептида НА.

На фиг. 10 показаны результаты анализа на основе проточной цитометрии, демонстрирующие увеличенный спектр иммунологической активности рекомбинантных полипептидов НА, что продемонстрировано приростом связывания 4К8 с дегликозилированными конструкциями.

На фиг. 11 показано иллюстративное расписание иммунизаций и последующей оценки *in vivo*.

На фиг. 12 показана типичная кривая выживаемости Каплана - Мейера для животных, иммунизированных с помощью модификаций DO2a следующего поколения по сравнению с оригинальным SMARTDO2a.

На фиг. 13 показаны типичные кривые потери веса у животных, иммунизированных с помощью модификаций DO2a следующего поколения по сравнению с оригинальным SMARTDO2a.

На фиг. 14 показаны типичные титры вируса в легких у животных, иммунизированных с помощью конструкций SMARTDO2a по сравнению с PBS на день 4 после контрольного заражения вирусом.

На фиг. 15 показаны типичные результаты анализа ингибирования гемагглютинации (HAI) для сывротки, полученной от животных, иммунизированных конструкциями SMARTDO2a.

Определения

В целях облегчения понимания настоящего изобретения ниже сперва определены некоторые термины. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов изложены во всем описании.

Адьювант. Как используется в данном документе, термин "адьювант" относится к веществу или среде-носителю, которые неспецифически усиливают иммунный ответ на антиген. Адьюванты могут включать суспензию минеральных веществ (алюминиевых квасцов, гидроксида или фосфата алюминия), на которых адсорбирован антиген; или эмульсию по типу "вода в масле", в которой раствор антигена эмульгирован в минеральном масле (например, MF59®), иногда с включением дезактивированных микобактерий (полный адьювант Фрейнда) для дополнительного усиления антигенности. В качестве адьювантов также можно применять иммуностимулирующие олигонуклеотиды (такие как включающие мотив CpG) (например, см. патенты США № 6194388, 6207646, 6214806, 6218371, 6239116, 6339068, 6406705 и 6429199). Адьюванты также включают биологические молекулы, такие как костимулирующие молекулы для лигандов TLR. Иллюстративные биологические адьюванты включают IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L и 41 BBL.

Животное. Как используется в данном документе, термин "животное" относится к любому представителю царства животных. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к людям на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к животным, отличным от человека, на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления животное, отличное от человека, представляет собой млекопитающее (например, грызуна, мышь, крысу, кролика, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата и/или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают без ограничения млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может представлять собой трансгенное животное, животное, полученное с помощью методов генной инженерии, и/или клон.

Антитело. Как используется в данном документе, термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, продуцируемой В-лимфоцитами, с конкретной аминокислотной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления выработку антител у людей или других животных индуцируют посредством специфического антигена (иммуногена). Антитела характеризуются специфической реакцией с антигеном некоторым наглядным способом, при этом каждый из антитела и антигена определяется относительно другого. Термины "обеспечение ответа с выработкой антител", "обеспечение выработки нейтрализующего антитела", "обеспечение иммуногенного ответа" или грамматические эквиваленты относятся к способности антигена или другой молекулы индуцировать продуцирование антител. В некоторых вариантах осуществления термин "антитела" относится к любым рекомбинантным антителам, применяемым в анализах *in vitro*, таких как скрининговые анализы на НА, в том числе к одному или более полипептидам главным образом кодируемым генами иммуноглобулина или фрагментами генов иммуноглобулина. Соответственно такие антитела могут существовать в виде интактных иммуноглобулинов или в виде фрагментов иммуноглобулинов классов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Иллюстративные фрагменты антител включают без ограничения F(ab)², Fab' и одноцепочечный Fv (scFv).

Антиген. Как используется в данном документе, термин "антиген" относится к средству, которое обеспечивает иммунный ответ; и/или к (ii) средству, связываемому T-клеточным рецептором (например, когда он презентруется молекулой МНС) или антителом (например, продуцируемым В-клеткой) при экспонировании или введении в организм. В некоторых вариантах осуществления антиген обеспечивает гуморальный ответ (например, включающий продуцирование антигенспецифических антител) в организме; в качестве альтернативы или дополнительно в некоторых вариантах осуществления антиген обеспечивает клеточный ответ (например, вовлекающий T-клетки, рецепторы которых специфически взаи-

модействуют с антигеном) в организме. Специалистам в данной области техники будет понятно, что конкретный антиген может обеспечивать иммунный ответ у одного или нескольких представителей целевого организма (например, мышей, кроликов, приматов, людей), но не у всех представителей вида целевого организма. В некоторых вариантах осуществления антиген обеспечивает иммунный ответ у по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% представителей вида целевого организма. В некоторых вариантах осуществления антиген связывается с антителом и/или Т-клеточным рецептором и может индуцировать или не индуцировать определенный физиологический ответ в организме. В некоторых вариантах осуществления, например, антиген может связываться с антителом и/или с Т-клеточным рецептором *in vitro*, независимо от того, происходит ли такое взаимодействие *in vivo* или нет. В некоторых вариантах осуществления антиген реагирует с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе с индуцируемыми гетерологичными иммуногенами. В некоторых вариантах осуществления раскрываемых композиций и способов антиген представляет собой полипептид НА вируса гриппа или его иммуногенный фрагмент.

Примерно. Как используется в данном документе, термин "примерно" или "приблизительно", заменяемый в отношении одного или более значений, представляющих интерес, относится к значению, сходному с указанным эталонным значением. В определенных вариантах осуществления термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону значений, находящихся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

Биологическая активность. Как используется в данном документе, фраза "биологическая активность" относится к наблюдаемому биологическому эффекту или результату, достигаемому с помощью средства или молекулы, представляющих интерес. Например, в некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой взаимодействие путем специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой модуляцию (например, индукцию, усиление или ингибирование) биологического пути или события. В некоторых вариантах осуществления наличие или степень биологической активности оценивают посредством детекции непосредственного или опосредованного продукта, продуцируемого посредством биологического пути или биологического события, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность полипептида НА относится к способности полипептида НА обеспечивать выработку нейтрализующего антитела. В данных случаях термин "биологическая активность" используется взаимозаменяемо с "иммуногенной активностью".

Согласно нумерации California 09. Как используется в данном документе, фраза "согласно нумерации California 09" или "согласно нумерации CA09" относится к нормализованному выравниванию биологических последовательностей, которое обеспечивает сравнение запрашиваемой последовательности (например, сконструированной полипептидной последовательности НА, в отношении которой были или будут выполнены одна или более описанных в данном документе модификаций) с рассматриваемой последовательностью (например, полипептидной последовательностью из A/California/07/2009 (H1N1)), таким образом выявляя аминокислотные остатки в целевой последовательности, которые соответствуют тому же положению A/California/07/2009 (H1N1), и, следовательно, все другое сходство биологической последовательности, нормализованное к A/California/07/2009 (H1N1). В большинстве случаев, целевая последовательность и запрашиваемая последовательность имеют общие характерные части или признаки, но немного отличаются по длине и/или идентичности последовательности. Например, нумерацию остатков в конкретной целевой последовательности или для целенаправленной модификации можно выявить и описать на основе последовательности белка A/California/07/2009 (H1N1). Последовательности выравнивают с полноразмерной последовательностью белка (включающей сигнальный пептид, трансмембранный и цитоплазматический хвостовые домены) A/California/07/2009 (номер доступа в NCBI: ACP44189, NCBI gi номер 227977172, 566 аминокислот). Остаток 1 представляет собой N-концевой метионин сигнального пептида.

Носитель. Как используется в данном документе, термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или среде-носителю, с которыми вводят композицию. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления носители могут включать стерильные жидкости, такие как, например, вода и масла, в том числе масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. В некоторых вариантах осуществления носители представляют собой или включают один или более твердых компонентов.

Характерная часть или признак. Как используется в данном документе, термин "характерная часть" или "характерный признак" применяют, в наиболее широком смысле, для отсылки к части вещества, наличие (или отсутствие) которой коррелирует с наличием (или отсутствием) конкретного признака, атрибута или активности у вещества. В некоторых вариантах осуществления характерная часть или признак вещества представляют собой часть или признак, которые обнаруживаются у вещества и у родственных веществ, которые обладают общим конкретным признаком, атрибутом или активностью, но не у тех, ко-

торые не обладают таким общим конкретным признаком, атрибутом или активностью. Например, термин "характерный пандемический признак" представляет собой признак, который обнаружен у по меньшей мере одного эталонного пандемического штамма и не обнаружен у по меньшей мере одного непандемического штамма. В некоторых вариантах осуществления характерный пандемический признак представляет собой признак, который широко встречается у пандемических штаммов и редко встречается у непандемических штаммов. Сходным образом, термин "характерный сезонный признак" представляет собой признак, который обнаружен у по меньшей мере одного эталонного сезонного штамма и не обнаружен по меньшей мере у одного несезонного штамма. В некоторых вариантах осуществления характерный сезонный признак представляет собой признак, который широко встречается у сезонных штаммов и редко встречается у несезонных штаммов. В некоторых вариантах осуществления характерная часть или признак представляют собой "характерный элемент последовательности", который обозначает элемент последовательности, встречающийся в полимере (например, в полипептиде или нуклеиновой кислоте), который представляет собой характерную часть такого полимера. В некоторых вариантах осуществления наличие характерного элемента последовательности коррелирует с наличием или уровнем конкретной активности или свойства полимера. В некоторых вариантах осуществления наличие (или отсутствие) характерного элемента последовательности определяет конкретный полимер в качестве представителя (или не представителя) конкретного семейства или группы таких полимеров (например, пандемических или сезонных). Характерный элемент последовательности обычно включает по меньшей мере два мономера (например, аминокислоты или нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления характерный элемент последовательности включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более мономеров (например, смежно связанных мономеров). В некоторых вариантах осуществления характерный элемент последовательности включает по меньшей мере первый и второй фрагменты смежных мономеров, разделенных одной или более спейсерными областями, длина которых может варьировать или не варьировать среди полимеров, которые обладают таким элементом последовательности. В некоторых вариантах осуществления характерный элемент последовательности включает наличие или отсутствие одного или более предполагаемых сайтов гликозилирования.

Технология оптимизированных вычислительными методами антигенов с широким спектром реактивности (COBRA). Как используется в данном документе, термины "оптимизированные вычислительными методами антигены с широким спектром реактивности" или технология "COBRA" относятся к методике и способам разработки, и полученным в результате соединениям, конструированным рекомбинантным антигенам НА вируса гриппа, описанным, например, в опубликованных через 18 месяцев с даты приоритета патентных публикациях WO 2012/036993, США № 2015/0030628, WO 2013/119683, WO 2013/148164, WO 2014/085616 и WO 2013/122827. Настоящие заявки включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Соответствующий. Как используется в данном документе, термин "соответствующий" зачастую используют для обозначения положения/идентичности аминокислотного остатка в полипептиде, представляющем интерес (например, полипептиде НА). Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что для простоты остатки в полипептиде зачастую обозначают с применением канонической системы нумерации на основе эталонного родственного полипептида так, что аминокислота, "соответствующая" остатку в положении 190, например, не обязательно должна быть 190-й аминокислотой в конкретной аминокислотной цепи, а скорее соответствует остатку, обнаруженному в положении 190 в эталонном полипептиде; средний специалист в данной области техники легко поймет как выявить "соответствующие" аминокислоты с применением, например, различных инструментов для выравнивания последовательностей.

Сконструированный. Как используется в данном документе, термин "сконструированный" описывает полипептид, аминокислотная последовательность которого была разработана специалистом в данной области техники и/или существование и получение которой нуждаются в действии специалиста в данной области техники (т.е. "в приложении руки человека"). Например, сконструированный полипептид НА имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотных последовательностей полипептидов НА, встречающихся в природных изолятах гриппа. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид НА имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности полипептидов НА, включенных в базу данных NCBI.

Эпитоп. Как используется в данном документе, термин "эпитоп" включает любой фрагмент, который специфически целиком или частично распознается связывающим компонентом иммуноглобулина (например, антителом или рецептором). В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из множества химических атомов или групп на антигене. В некоторых вариантах осуществления такие химические атомы или группы экспонированы на поверхности, когда антиген принимает соответствующую трехмерную конформацию. В некоторых вариантах осуществления такие химические атомы или группы находятся в физической близости друг к другу в пространстве, когда антиген принимает такую конформацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере некоторые такие химические атомы представляют собой группы, физически отделенные друг от друга, когда антиген принимает альтернативную конформацию (например, линейаризованный вид).

Вспомогательное вещество. Как используется в данном документе, термин "вспомогательное вещество" относится к нетерапевтическому средству, которое можно включить в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или содействия достижению требуемой консистенции или стабилизирующего эффекта. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п.

Область головки. Как используется в данном документе, термин "область головки" относится к сегменту, охватываемому аминокислотными остатками 59-292 (согласно нумерации CA09) сконструированного полипептида HA или полипептида HA дикого типа. С точки зрения морфологии, область головки можно определить как имеющий глобулярную форму домен HA.

Полипептид гемагглютинина (HA). Как используется в данном документе, термин "полипептид гемагглютинина" (или "полипептид HA") относится к полипептиду, аминокислотная последовательность которого включает по меньшей мере одну характерную последовательность HA. Из уровня техники известно большое разнообразие последовательностей HA из изолятов гриппа; действительно Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) поддерживает базу данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>), которая, на момент подачи настоящей заявки, включала по меньшей мере 15491 полных полипептида HA из гриппа А (подтипа H1N1) в базе данных (из них 6974 являются уникальными). Специалист в данной области техники, приводя ссылку на эту базу данных, может легко выявить последовательности, которые характерны для полипептидов HA в целом и/или для конкретных полипептидов HA (например, полипептидов H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 или H16; или HA, которые опосредуют инфицирование конкретных хозяев, например, птицы, верблюда, собаки, кошки, виверры, окружающей среды, лошади, человека, леопарда, норки, мыши, тюленя, куницы каменной, свиньи, тигра, кита и т.д.). Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид HA включает один или более характерных элементов последовательности, обнаруженных между остатками приблизительно 97 и приблизительно 185, приблизительно 324 и приблизительно 340, приблизительно 96 и приблизительно 100 и/или приблизительно 130 и приблизительно 230 белка HA, обнаруженного в природном изоляте вируса гриппа.

Полипептид HA H1N1. "Полипептид HA H1N1", как данный термин используется в данном документе, представляет собой полипептид HA, аминокислотная последовательность которого включает по меньшей мере один элемент последовательности, который характерен для H1N1 и отличает H1N1 из других подтипов HA. Такие типичные элементы последовательности можно определить посредством выравнивания, как это будет понятно специалисту в данной области техники.

Хозяин. Термин "хозяин" используется в данном документе для обозначения системы (например, клетки, организма и т.д.), в которой присутствует полипептид, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления хозяин представляет собой систему, которая восприимчива к инфицированию конкретным возбудителем инфекции. В некоторых вариантах осуществления хозяин представляет собой систему, которая экспрессирует конкретный полипептид, представляющий интерес.

Клетка-хозяин. Как используется в данном документе, фраза "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую была включена экзогенная ДНК (рекомбинантная или другого типа). Например, клетки-хозяева можно применять для получения описанных в данном документе сконструированных полипептидов гемагглютинина вируса гриппа с помощью стандартных рекомбинантных методик. После прочтения данного раскрытия специалист в данной области техники поймет, что такие термины обозначают не только конкретную рассматриваемую клетку, но и потомство такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут присутствовать определенные модификации вследствие мутации либо влияния окружающей среды, такое потомство в действительности может не являться идентичным родительской клетке, но по-прежнему включено в объем термина "клетка-хозяин", как используется в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева включают любые прокариотические и эукариотические клетки, которые подходят для экспрессии экзогенной ДНК (например, рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты). Иллюстративные клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточные или многоклеточные), клетки бактерий (например, штаммы *E.coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, дрожжевые клетки (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т.д.), клетки растений, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, инфицированные бакуловирусом клетки насекомых, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животного, отличного от человека, клетки человека или слитые клетки, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, V Reggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальной), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, миеломной клетки, опухолевой клетки и линии клеток, полученной из вышеупомянутой клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

Иммунный ответ. Как используется в данном документе, термин "иммунный ответ" относится к ответу клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка, дендритная клетка, макрофаг или полиморфноядерный лейкоцит, на стимул, такой как антиген или вакцина. Иммунный ответ может включать любую клетку организма, вовлеченную в защитный ответ хозяина, включая, например, эпителиальную клетку, которая секретирует интерферон или цитокин. Иммунный ответ включает без ограничения врожденный и/или адаптивный иммунный ответ. Как используется в данном документе, защитный иммунный ответ относится к иммунному ответу, который защищает субъекта от инфицирования (предупреждает инфицирование или предупреждает развитие заболевания, связанного с инфицированием). Способы измерения иммунных ответов хорошо известны из уровня техники и включают, например, измерение пролиферации и/или активности лимфоцитов (таких как В- или Т-клетки), секреции цитокинов или хемокинов, воспаления, продуцирования антител и т.п.

Иммуноген. Как используется в данном документе, термин "иммуноген" относится к соединению, композиции или веществу, которые в соответствующих условиях способны стимулировать иммунный ответ, такой как продуцирование антител или Т-клеточный ответ, у животного, в том числе к композициям, которые вводят инъекцией животному или всасываются у животного. Как используется в данном документе, "иммуногенная композиция" представляет собой композицию, содержащую иммуноген (такой как полипептид НА). Как используется в данном документе, "иммунизировать" означает сделать субъекта, защищенным от инфекционного заболевания, например, путем вакцинации.

In vitro. Как используется в данном документе, термин "in vitro" относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в тестовой пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т.д., а не в многоклеточном организме.

In vivo. Как используется в данном документе, термин "in vivo" относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек и животное, отличное от человека. В контексте клеточных систем данный термин можно использовать в отношении событий, которые происходят в живой клетке (в отличие от, например, систем in vitro).

Вирус гриппа. Как используется в данном документе, термин "вирус гриппа" относится к вирусу с РНК с отрицательной цепью и сегментированным геномом, который принадлежит к семейству Orthomyxoviridae.

Вакцина против вируса гриппа. Как используется в данном документе, термин "вакцина против вируса гриппа" относится к иммуногенной композиции, способной стимулировать иммунный ответ, которую вводят для предупреждения, облегчения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. Вакцина против вируса гриппа может включать, например, аттенуированный или инактивированный (например, расщепленный) вирус гриппа, вирусоподобные частицы (VLP), и/или антигенные полипептиды (например, сконструированные гемагглютинины, описанные в данном документе), или полученную из них ДНК, или любой рекомбинантный вариант таких иммуногенных материалов.

Выделенный. Как используется в данном документе, термин "выделенный" относится к средству или молекуле, которая либо (i) была отделена по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она была связана при первоначальном получении (независимо от того, в природных или в экспериментальных условиях); либо (ii) получена посредством производимых человеком манипуляций. Выделенные средства или молекулы можно отделить по меньшей мере от приблизительно 10%, по меньшей мере от приблизительно 20%, по меньшей мере от приблизительно 30%, по меньшей мере от приблизительно 40%, по меньшей мере от приблизительно 50%, по меньшей мере от приблизительно 60%, по меньшей мере от приблизительно 70%, по меньшей мере от приблизительно 80%, по меньшей мере от приблизительно 90% или более других компонентов, с которыми они первоначально были связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные средства характеризуются степенью чистоты, составляющей более 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%.

Вспышка. Как используется в данном документе, "вспышка" вируса гриппа относится к коллекции изолятов вируса из одной страны за определенный год.

Пандемический или сезонный штамм. "Пандемический" штамм вируса гриппа представляет собой штамм, который вызвал или обладает способностью вызывать пандемическую инфекцию среди групп населения. В некоторых случаях пандемия представляет собой глобальную вспышку заболевания, которая возникает, когда новый вирус появляется или "возникает" среди населения, обеспечивает серьезную болезнь, а затем легко распространяется среди людей во всем мире. В большинстве случаев пандемические штаммы охватывают период с 2009 г. по настоящее время и образуют единый кластер антигенно сходных с A/California/07/2009 генетических последовательностей. В более общем плане пандемические штаммы гриппа включают те, которые возникают в результате реассортации (антигенного сдвига, происходящего примерно каждые 20-30 лет) между вирусами гриппа человека и птиц или свиней, что приводит к появлению вируса с новым НА птичьего или свиного происхождения, против которого у людей нет иммунитета. Иными словами, считается, что население является не подвергавшимся воздействию, не обладающим устойчивостью или обладающим незначительной устойчивостью либо в результате пред-

шествующей вакцинации, либо предшествующего воздействия. Пандемические и сезонные штаммы являются антигенно отличающимися и очень различаются по последовательности. В большинстве случаев, сезонные штаммы гриппа можно определить как циркулирующие штаммы за период с 1986 по 2009 г. (включая последовательности штаммов 2009 г., которые не являются пандемическими) и другие штаммы, которые имеют практически сходные генетические последовательности, кодирующие антигенные области (т.е. сходные в пространстве антигенные последовательности). Иллюстративные пандемические штаммы включают A/California/07/2009, A/California/04/2009, A/Belgium/145/2009, A/South Carolina/01/1918 и A/New Jersey/1976. Пандемические подтипы включают, в частности, подтипы H5N1, H2N2, H9N2, H7N7, H7N3, H7N9 и H10N7. Иллюстративные сезонные штаммы включают A/Texas/36/1991, A/Singapore/1986, A/New Caledonia/20/1999, A/Solomon Islands/03/2006 и A/Brisbane/59/2007, а также A/Wisconsin/67/2005.

Предупреждение. Как используется в данном документе, термин "предупреждение" относится к профилактике, недопущению проявления заболевания, задержке начала и/или уменьшению частоты и/или тяжести одного или более симптомов конкретного заболевания, нарушения или состояния (например, инфицирования, например, вирусом гриппа). В некоторых вариантах осуществления степень предупреждения оценивают исходя из популяции, так что считают, что средство "предупреждает" конкретное заболевание, нарушение или состояние, если в популяции, восприимчивой к заболеванию, нарушению или состоянию, наблюдается статистически значимое уменьшение развития, частоты и/или интенсивности одного или более симптомов заболевания, нарушения или состояния.

Сайт связывания с рецептором (RBS). Как используется в данном документе, термин "сайт связывания с рецептором" или "RBS" предусматривает смежные или несмежные аминокислотные остатки области головки полипептида HA вируса гриппа, которые включают аминокислоты, вовлеченные в непосредственное связывание сиаловых кислот с рецепторными белками целевой клетки. Область HA, ответственная за связывание с рецептором, находится на удаленном от мембраны конце каждого мономера тримера HA и имеет несколько основных структурных признаков. Например, сайт связывания фланкирован "петлями 220 и 130", которые содержат аминокислоты, которые взаимодействуют с сиаловой кислотой или внутренними сахарами гликановой цепи. Удаленная от мембраны область сайта образована спиралью 190, которая также включает остатки, обладающие способностью связываться с рецептором либо по сиаловой кислоте (остаток 194), либо с внутренними гликанами на рецепторе (примерно остатки 190 и 193). Основание сайта содержит несколько высококонсервативных остатков, которые образуют обширную сеть водородных связей. Аминокислотные остатки, которые составляют "сайт связывания с рецептором" или "RBS" полипептида HA вируса гриппа, можно описать из трехмерных кристаллических структур полипептидов HA, образующих комплекс с аналогами сиаловой кислоты, и выявления аминокислотных остатков в определенной близости к аналогу или можно описать в отношении полипептидной последовательности HA из конкретного вирусного штамма (например, A/New Caledonia/20/99 или A/California/07/2009). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления "сайт связывания с рецептором" или "RBS" сконструированного полипептида HA, описанного в данном документе, можно определить с применением эталонной последовательности полипептида HA. В некоторых вариантах осуществления "сайт связывания с рецептором" или "RBS" сконструированного полипептида HA, описанного в данном документе, можно определить с применением кристаллических структур последовательности полипептида HA в комплексе с аналогами рецептора человека и птицы (например, LSTa, LSTc). Иллюстративная эталонная кристаллическая структура последовательности полипептида HA в комплексе с LSTc включает A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) pdb|1RVZ. В некоторых вариантах осуществления RBS можно определить как эпитоп, связываемый нейтрализующим моноклональным антителом CH65 с широким спектром связывания (см., например, Whittle J.R. et al. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108:14216-21). В качестве альтернативы или дополнительно, RBS можно определить как участок, включающий все аминокислотные остатки в пределах 15 ангстремов от универсально консервативного триптофана, соответствующего положению 167 в (согласно нумерации CA09 09) (например, см. Xu, R. et al. Nat Struct Mol Biol. 2013 Mar; 20(3):363-70).

Рекомбинантный. Как используется в данном документе, термин "рекомбинантный" предназначен для обозначения полипептидов (например, полипептидов HA, описанных в данном документе), которые разработаны, сконструированы, получены, экспрессированы, созданы или выделены посредством рекомбинантных способов, таких как полипептиды, экспрессированные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, полипептиды, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных полипептидов, или полипептиды, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные посредством любого другого способа, который предусматривает сплайсинг выбранных элементов последовательности друг с другом. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности присутствуют в природе. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности разработаны *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности получены в результате мутагенеза (например, *in vivo* или *in vitro*) известного элемента последовательности, например, из природного или синтетического источника. В некоторых вариантах осуществления

один или более таких выбранных элементов последовательности получены посредством комбинации нескольких (например, двух или более) известных элементов последовательности, которые в природе не присутствуют в том же полипептиде (например, два эпитопа из двух отдельных полипептидов НА).

Рекомбинантная вакцина против вируса гриппа. Как используется в данном документе, термин "рекомбинантная вакцина против вируса гриппа" относится к иммуногенной композиции, специфической в отношении гриппа, содержащей описанные в данном документе сконструированные гемагглютинины гриппа, в том числе без ограничения, вирус гриппа, препараты на основе его субъединиц, вирусоподобные частицы, рекомбинантный белок (т.е. препараты, состоящие из рекомбинантного НА, очищенного до различной степени) и вакцинам на основе ДНК- и вирусных векторов. Рекомбинантные вакцины против вируса гриппа, описанные в данном документе, необязательно могут содержать один или более адъювантов.

Рекомбинантный полипептид гемагглютинина. Как используется в данном документе, термин "рекомбинантный полипептид гемагглютинина (НА)" относится к любому модифицированному полипептиду гемагглютинина. В частности, термин относится к дополнительно модифицированным или сконструированным полипептидам гемагглютинина.

Специфичность. Как известно из уровня техники, "специфичность" представляет собой меру способности конкретного лиганда (например, антитела, полипептида НА и т.д.) отличать своего партнера по связыванию (например, антиген, рецептор НА человека и, в частности, рецептор НА верхних дыхательных путей человека) от других потенциальных партнеров по связыванию (например, рецептора НА птиц).

Стеблевая область. Как используется в данном документе, термин "стеблевая область" или "стволовая область" может относиться к неоднородной области сконструированного полипептида НА или полипептида НА дикого типа, при этом область содержит примерно аминокислотные остатки 18-58 и 293-519 (согласно нумерации СА09). С точки зрения морфологии стеблевую область можно определить как удлиненный домен, который выходит из глобулярной головки.

Субъект. Как используется в данном документе термин "субъект" означает любое млекопитающее, в том числе людей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения субъект представляет собой взрослого, подростка или младенца. В некоторых вариантах осуществления применяют термины "индивидуум" или "пациент" и подразумевается, что они взаимозаменяемы с термином "субъект". Настоящее изобретение также охватывает введение фармацевтических композиций и/или осуществление способов лечения в утробе.

Практически. Как используется в данном документе, термин "практически" относится к качественному состоянию, при котором характеристика или свойство, представляющие интерес, демонстрируются в полном или почти полном объеме или степени. Среднему специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические явления редко, если это вообще имеет место, происходят до конца и/или продолжаются до завершения или достижения или избегания абсолютного результата. Термин "практически" используется, таким образом, в данном документе для охвата потенциального отсутствия завершения, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

Практически сходный. Как используется в данном документе, термин "практически сходный" относится к сравнению двух молекул. В большинстве случаев, молекулы считают "практически сходными" в отношении друг друга, когда они характеризуются достаточным структурным сходством (например, характерный структурный признак), чтобы они имели сопоставимую вероятность наличия у них одного или более дополнительных атрибутов или признаков. В качестве лишь одного примера, характеристика, например, паттерн сайтов гликозилирования, являющаяся либо такой же, либо достаточно сходной у двух штаммов вируса гриппа, означает, что риск пандемии среди людей для каждого штамма одинаковый.

Практически гомологичная последовательность. Фраза "практически гомологичный" используется в данном документе в отношении сравнения между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно среднему специалисту в данной области техники, две последовательности обычно считаются "практически гомологичными", если они содержат гомологичные остатки в соответствующих положениях. Гомологичные остатки могут представлять собой идентичные остатки. В качестве альтернативы, гомологичные остатки могут представлять собой неидентичные остатки, обладающими соответствующими сходными структурными и/или функциональными характеристиками. Например, как хорошо известно среднему специалисту в данной области техники, определенные аминокислоты обычно классифицируют как "гидрофобные" или "гидрофильные" аминокислоты и/или как имеющие "полярные" или "неполярные" боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же типа часто может считаться "гомологичной" заменой. Типичные категории аминокислот обобщены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральный	1,8
Аргинин	Arg	R	полярная	положительный	-4,5
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральный	-3,5
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	отрицательный	-3,5
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральный	2,5
Глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	отрицательный	-3,5
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральный	-3,5
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральный	-0,4
Гистидин	His	H	полярная	положительный	-3,2
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральный	4,5
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральный	3,8
Лизин	Lys	K	полярная	положительный	-3,9
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральный	1,9
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральный	2,8
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральный	-1,6
Серин	Ser	S	полярная	нейтральный	-0,8
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральный	-0,7
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральный	-0,9
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральный	-1,3
Валин	Val	V	неполярная	нейтральный	4,2

Таблица 2

Неоднозначные аминокислоты	3-буквенное обозначение	1-буквенное обозначение
Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
Лейцин или изолейцин	Xle	J
Неуказанная или неизвестная аминокислота	Xaa	X

Как хорошо известно из уровня техники, аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот можно сравнивать с применением любого из ряда алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с гэпами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Такие иллюстративные программы описаны в Altschul et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener et al. (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, том 132), Humana Press, 1999; все вышеперечисленное из которых включено в данный документ посредством ссылки. В дополнение к выявлению гомологичных последовательностей, программы, упомянутые выше, обычно дают представление о степени гомологии. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются практически гомологичными, если по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более их соответствующих остатков являются гомологичными на протяжении значимого фрагмента из остатков. В некоторых вариантах осуществления значимый фрагмент представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления значимый фрагмент составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375, по меньшей мере 400, по меньшей мере 425, по меньшей мере 450, по меньшей мере 475, по меньшей мере 500 или более остатков.

Практически идентична. Фраза "практически идентична" или "практически идентичная" используется в данном документе в отношении сравнения между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно среднему специалисту в данной области техники, две последовательности обычно считаются "практически идентичными", если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Как хорошо известно из уровня техники, аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот можно сравнивать с применением любого из ряда алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах,

таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с гэпами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Такие иллюстративные программы описаны в Altschul et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener et al. (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, том 132), Humana Press, 1999. В дополнение к выявлению идентичных последовательностей, программы, упомянутые выше, обычно дают представление о степени идентичности. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются практически идентичными, если по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более их соответствующих остатков являются идентичными на протяжении значимого фрагмента из остатков. В некоторых вариантах осуществления значимый фрагмент представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления значимый фрагмент составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более остатков. В контексте полипептида HA ссылка на "практически идентичный" обычно относится к полипептиду HA (или эпитопу HA), имеющему аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90%, предпочтительно на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичной последовательности эталонного полипептида HA (или эпитопа HA).

Вакцинация. Как используется в данном документе, термин "вакцинация" или "вакцинирование" относится к введению композиции, предназначенной для выработки иммунного ответа, например, на болезнетворный фактор. Вакцинацию можно осуществлять до, во время и/или после контакта с болезнетворным фактором и/или развития одного или более симптомов, и в некоторых вариантах осуществления до, во время и/или вскоре после контакта с таким фактором. В некоторых вариантах осуществления вакцинация включает многократные введения композиции для вакцинации с соответствующими интервалами времени между ними.

Вирусоподобная частица (VLP). Как используется в данном документе, фраза "вирусоподобная частица" или "VLP" относится к частицам, которые напоминают вирус, но лишены какого-либо вирусного генетического материала и, как следствие, не являются инфекционными. "Вирусоподобную частицу" или "VLP" можно получить с помощью гетерологичной экспрессии в ряде систем культур клеток, включая линии клеток млекопитающих, линии клеток насекомых, клетки дрожжей и клетки растений. Кроме того, VLP можно очистить посредством способов, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе VLP на основе вируса гриппа содержит полипептиды гемагглютинина (HA) и полипептиды нейраминидазы (NA). В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе VLP на основе вируса гриппа содержит полипептиды HA, полипептиды NA и/или вирусные структурные полипептиды (например, структурный белок гриппа, такой как M1 гриппа). В некоторых определенных вариантах осуществления описанная в данном документе VLP на основе вируса гриппа содержит полипептиды HA, полипептиды NA и/или полипептиды M1. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе VLP на основе вируса гриппа содержит полипептиды HA, полипептиды NA и/или полипептиды HIV gag. Как известно специалисту в данной области техники, в качестве альтернативы проиллюстрированным в данном документе, можно применять другие вирусные структурные белки. VLP на основе вируса гриппа можно получить посредством трансфекции клеток-хозяев (например, клеток млекопитающих) с помощью плазмид, кодирующих белки HA и NA и необязательно белки gag HIV. После инкубирования трансфицированных клеток в течение соответствующего времени, обеспечивающего экспрессию белка (такого как в течение примерно 72 ч), VLP можно выделить из надосадочных жидкостей культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления описываемые в данном документе VLP на основе вируса гриппа получают посредством временной трансфекции в клетках млекопитающих (например, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления VLP на основе вируса гриппа анализируют с применением одного или более анализов. В качестве лишь нескольких примеров, VLP на основе вируса гриппа можно проанализировать в отношении активности гемагглютинина, динамического рассеяния света и для количественной оценки содержания гемагглютинина посредством окрашивания белка. Другие анализы станут легко понятны специалисту в данной области техники после ознакомления с настоящим изобретением.

Дикого типа. Как понятно из уровня техники, фраза "дикого типа" обычно относится к нормальной форме белка или нуклеиновой кислоты, встречающихся в природе. Например, полипептиды HA дикого типа присутствуют в природных изолятах вируса гриппа. Ряд различных последовательностей HA дикого типа можно обнаружить в базе данных последовательностей вируса гриппа NCBI, доступной в Интернете по адресу ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.

Подробное описание определенных вариантов осуществления

Настоящее изобретение предусматривает, помимо прочего, способы модификации сконструированных полипептидов HA для изменения иммунных профилей и повышения перекрестной реактивности к различным штаммам гриппа. Варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают раз-

личные стратегии конструирования полипептидов HA для расширения сезонного профиля ответа с целью охвата пандемических штаммов. В некоторых вариантах осуществления стратегия разработана для введения модификаций вблизи сайта связывания рецептора (RBS) полипептида HA хозяина на основе последовательностей, полученных из полипептида HA с отличным профилем иммуногенности. Сходные стратегии можно применять для расширения пандемического профиля ответа с целью охвата сезонных штаммов.

Настоящее изобретение предусматривает улучшенные модифицированные рекомбинантные полипептиды HA с расширенным профилем иммуногенности, охват которого распространяется (т.е. способность обеспечивать иммунный ответ на полипептид HA) на антигенно отличающиеся штаммы гриппа, например, на новые или дополнительные пандемические и/или сезонных штаммов вируса гриппа. Настоящее изобретение, отчасти, основано на модификациях, выведенных по результатам анализа *in silico* вариации последовательности среди циркулирующих штаммов вируса гриппа, картирования антигенной области HA и/или профилей эпитопов и структурного анализа пептида HA. Целенаправленные модификации можно впоследствии вводить в различные местоположения аминокислотных остатков и/или конкретные области полипептида HA с известным иммунным профилем с получением новых полипептидов HA с улучшенными и более сбалансированными иммунными профилями. Как подробно описано ниже, в том числе в разделе "Примеры", авторы настоящего изобретения разработали, помимо прочего, отличные определенные стратегии конструирования полипептидов HA для расширения сезонного профиля ответа с целью охватывания пандемических штаммов или наоборот данные стратегии расширяют иммунный профиль по кластерам последовательностей (или кладам) антигенно отличающихся штаммов; их можно применять в отношении сконструированной рекомбинантной молекулы HA с течением времени так, чтобы она продолжала обеспечивать иммунный ответ на подверженные антигенному дрейфу циркулирующие сезонные штаммы. Во всех случаях данная стратегия разработана, в целом, для сохранения конкретных остатков сайта связывания с рецептором (RBS) у полипептида HA хозяина с модификациями, сконструированными в области, близкой к RBS. Сходные стратегии можно применять для расширения пандемического профиля ответа с целью охвата сезонных штаммов. Композиции и способы по настоящему изобретению применимы к большому разнообразию рекомбинантных полипептидов HA, в том числе тех, которые сконструированы посредством множества способов и которые главным образом содержат последовательности дикого типа.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полипептид гемагглютинина (HA), содержащий сконструированную область головки или ее сегмент, полученные из сконструированного полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем, и стеблевую область, происходящую из пандемического штамма. В некоторых вариантах осуществления сконструированная область головки или ее сегмент содержат последовательность, которая является на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотам, соответствующим положениям 135-269, 125-277 или 63-278 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления сконструированная область головки или ее сегмент содержит последовательность, которая является идентичной аминокислотам, соответствующим положениям 135-269, 125-277 или 63-278 из SEQ ID NO: 1 (последовательность SMART_DO2a).

В некоторых вариантах осуществления стеблевая область происходит из встречающегося в природе пандемического штамма или пандемического штамма дикого типа. В некоторых вариантах осуществления подходящий встречающийся в природе пандемический штамм выбран из A/California/07/2009, A/New Jersey/10/1976 или A/South Carolina/1/1918. В некоторых вариантах осуществления стеблевая область происходит из сконструированного полипептида HA, который характеризуется пандемическим иммунным профилем.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид HA, который характеризуется пандемическим иммунным профилем, сконструирован с помощью технологии оптимизированных вычислительными методами антигенов, обеспечивающих широкий спектр реактивности (COBRA), технологии создания мозаиков, комбинаций штаммов на основе консенсусных последовательностей гриппа, удаления и/или перестройки структурных доменов, замены доменов или комбинаций нейтрализующих или перекрестно-реактивных эпитопов, характерных для нескольких штаммов вируса гриппа.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полипептид гемагглютинина вируса гриппа (HA), содержащий сконструированную область головки, происходящую из полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем и предусматривающую одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок в пределах одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования, которые определяются консенсусной последовательностью NxS/Ty, где x и y не представляют собой пролин (P), за счет чего обеспечивается разрушение одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования. В конкретных вариантах осуществления каждая из одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок происходит из соответствующей последовательности пандемического штамма.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полипептид гемагглютинина вируса гриппа (HA), содержащий сконструированную область головки, происходящую из поли-

пептида HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем, в которую был вставлен один или более сконструированных предполагаемых сайтов N-гликозилирования, которые определяются консенсусной последовательностью NxS/Ty, где x и y не представляют собой P. В конкретных вариантах осуществления каждый из одного или более сконструированных предполагаемых сайтов N-гликозилирования сконструирован с помощью аминокислотных замен, делеций или вставок исходя из соответствующей последовательности сезонного штамма.

В некоторых вариантах осуществления гемагглютинин соответствует гриппу типа A. В некоторых вариантах осуществления грипп типа A относится к подтипу H1N1.

В некоторых вариантах осуществления один или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования соответствуют положениям 142-145 и/или 177-179 (нормализованные результаты выравнивания последовательности с A/California/07/2009 HA (SEQ ID NO: 2); "согласно нумерации CA09"). В некоторых вариантах осуществления один или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования находятся в пределах 15 ангстрем от сайта связывания с рецептором (RBS), при этом RBS определен как все аминокислотные остатки в пределах 15 ангстрем от положения, соответствующего W167 (согласно нумерации CA09) в трехмерной (3D) структуре. В качестве альтернативы, RBS можно определить как эпитоп, связываемый паратопом моноклонального антитела CH65, и при этом одна или более аминокислотных замен присутствуют рядом с (например, в пределах 100 аминокислотных остатков, в пределах 75 аминокислотных остатков, в пределах 50 аминокислотных остатков, в пределах 40 аминокислотных остатков, в пределах 30 аминокислотных остатков, в пределах 25 аминокислотных остатков, в пределах 20 аминокислотных остатков, в пределах 15 аминокислотных остатков, в пределах 10 аминокислотных остатков, в пределах 5 аминокислотных остатков и т.д.) эпитопом CH65. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок выбраны из приведенных в данном документе перечней или таблиц, например табл. 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок предусматривают модификацию консенсусной последовательности NxS/Ty в $z^1z^2z^3z^4$, где z^1 представляет собой N, D, K или S; z^2 представляет собой Y или остается без изменений; z^3 представляет собой E, D или N; и z^4 представляет собой I, L, P, S или T или остается без изменений.

В некоторых вариантах осуществления пандемический или сезонный штамм, из которого происходят одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок, представляет собой циркулирующий штамм вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий штамм вируса гриппа выбран из группы, состоящей из A/California/07/2009 и A/South Carolina/1/1918. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, делеции или вставки предусматривают введение остатка лизина (K) или аргинина (R) в пределах 1-5 аминокислот (например, в пределах 1-4, 1-3, 1-2 аминокислот) от консенсусной последовательности NxS/Ty. В некоторых вариантах осуществления остаток лизина (K) или аргинина (R) находится в пределах 1-5 аминокислот (например, в пределах 1-4, 1-3, 1-2 аминокислот) в направлении 3' от консенсусной последовательности NxS/Ty. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок предусматривают вставку в положении, соответствующем остатку 147 (согласно нумерации CA09). В некоторых вариантах осуществления вставка в положении, соответствующем остатку 147, предусматривает вставку лизина (K) или аргинина (R).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полипептид HA вируса гриппа, содержащий сконструированную область головки, происходящую из полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем и предусматривающую одну или более аминокислотных замен между положениями, соответствующими 60 и 291 (согласно нумерации CA09), где каждая из одной или более аминокислотных замен происходит из соответствующей последовательности пандемического штамма. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен, выбранных из приведенных в данном документе перечней или таблиц, например табл. 6. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен находятся между положениями, соответствующими 137 и 262 (согласно нумерации CA09), и при этом одна или более аминокислотных замен выбраны из табл. 7. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен предусматривают две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более аминокислотных замен, выбранных из табл. 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен предусматривают по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных замен, выбранных из табл. 6 или 7. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен присутствуют в положениях, соответствующих 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213, 214, 244, 245 и/или 262 (согласно нумерации CA09).

В родственном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полипептид HA вируса гриппа, содержащий сконструированную область головки, происходящую из полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем и предусматривающую одну или более аминокислотных замен в пределах 15 ангстрем от сайта связывания с рецептором (RBS), при этом RBS определен как все аминокислотные остатки в пределах 15 ангстрем от положения, соответствующего W167 (согласно нумерации CA09) в трехмерной (3D) структуре, где каждая из одной или более аминокислотных замен происходит из соответствующей последовательности пандемического штамма. В качестве альтернативы,

RBS можно определить как эпитоп, связываемый паратопом моноклонального антитела СН65, и при этом одна или более аминокислотных замен присутствуют рядом с (например, в пределах 100 аминокислотных остатков, в пределах 75 аминокислотных остатков, в пределах 50 аминокислотных остатков, в пределах 40 аминокислотных остатков, в пределах 30 аминокислотных остатков, в пределах 25 аминокислотных остатков, в пределах 20 аминокислотных остатков, в пределах 15 аминокислотных остатков, в пределах 10 аминокислотных остатков, в пределах 5 аминокислотных остатков и т.д.) эпитопом СН65.

В некоторых вариантах осуществления пандемический штамм представляет собой циркулирующий вирус гриппа. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен находятся в пределах 10 (например, в пределах 9, 8, 7, 6, 5 и т.д.) ангстремов от сайта связывания с рецептором (RBS). В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен предусматривают две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более аминокислотных замен, выбранных из табл. 8. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен предусматривают по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных замен, выбранных из табл. 8. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен присутствуют в положениях, соответствующих 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213 и/или 214 (согласно нумерации СА09).

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полипептид НА вируса гриппа, содержащий сконструированную область головки, происходящую из полипептида НА с преимущественно сезонным иммунным профилем и содержащую одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из табл. 9 (например, два или более, три или более, четыре или более, пять или более модификаций, выбранных из табл. 9).

В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с преимущественно сезонным иммунным профилем или полипептид НА с преимущественно пандемическим иммунным профилем, подходящим для настоящего изобретения, сконструированы с помощью технологии оптимизированных вычислительными методами антигенов, обеспечивающих широкий спектр реактивности (COBRA), технологии создания мозаиков, комбинаций штаммов вируса гриппа на основе консенсусных последовательностей вируса гриппа, удаления и/или перестройки структурных доменов, замены доменов или комбинаций нейтрализующих или перекрестно-реактивных эпитопов, характерных для нескольких штаммов вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид НА обеспечивает выработку нейтрализующих антител против как сезонных, так и пандемических штаммов вируса гриппа. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный полипептид НА обеспечивает выработку нейтрализующих антител против одного или более сезонных штаммов и еще одного пандемического штамма вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид НА характеризуется более сбалансированным профилем иммуногенности в отношении как сезонных, так и пандемических штаммов вируса гриппа.

Помимо прочего, настоящее изобретение предусматривает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в данном документе рекомбинантный полипептид НА, и вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую такой вектор или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления подходящая клетка представляет собой клетку человека. В конкретных вариантах осуществления клетка человека представляет собой клетку НЕК-293. В некоторых вариантах осуществления подходящая клетка представляет собой клетку обезьяны. В конкретных вариантах осуществления клетка обезьяны представляет собой клетку Vero.

В различных дополнительных аспектах настоящее изобретение предусматривает вирусоподобные частицы (VLP), содержащие описанный в данном документе рекомбинантный полипептид НА. В некоторых вариантах осуществления VLP в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит белок, представляющий собой нейраминидазу (NA) вируса гриппа, белок gag вируса иммунодефицита человека (HIV) или и то и другое. Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие описанные в данном документе рекомбинантный полипептид НА или VLP. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает способы выработки иммунного ответа (например, иммунизацию или вакцинацию) на сезонный и пандемический вирусы гриппа у субъекта путем введения описанной в данном документе фармацевтической композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА. В некоторых вариантах осуществления способ изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА предусматривает выбор области головки сконструированного полипептида НА и замену выбранной областью головки сконструированного полипептида НА соответствующей области головки полипептида НА с отличным профилем иммуногенности, за счет чего обеспечивается получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид НА характеризуется преимущественно сезонным иммунным профилем, а полипептид НА с отличным профилем иммуногенности характеризуется преимущественно пандемическим иммунным профилем.

В некоторых вариантах осуществления выбранная область головки сконструированного полипеп-

тида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем соответствует остаткам 63-278, 125-277 или 135-269 (согласно нумерации CA09). В некоторых вариантах осуществления соответствующая область головки полипептида HA с отличимым профилем иммуногенности, который является преимущественно пандемическим, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из остатков 63-277 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа (последовательность HA A/California/07/2009)], остатков 63-277 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа], остатков 63-277 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа], остатков 125-277 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа], остатков 125-277 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа], остатков 125-277 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа], остатков 135-269 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа], остатков 135-269 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа] или остатков 135-269 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа].

В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с отличимым профилем иммуногенности, который является преимущественно пандемическим, представляет собой полипептид HA из вируса гриппа дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с отличимым профилем иммуногенности, который является преимущественно пандемическим, представляет собой сконструированный полипептид HA. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с отличимым профилем иммуногенности, который является преимущественно пандемическим, содержит SEQ ID NO: 5 (полноразмерная последовательность для DO1A).

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид HA характеризуется преимущественно пандемическим иммунным профилем, а полипептид HA с отличимым профилем иммуногенности характеризуется преимущественно сезонным иммунным профилем. В некоторых вариантах осуществления выбранная область головки сконструированного полипептида HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем выбрана из группы, состоящей из остатков 63-277 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа (последовательность HA A/California/07/2009)]; остатков 63-277 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа]; остатков 63-277 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа]; остатков 125-277 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа]; остатков 125-277 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа]; остатков 125-277 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа]; остатков 135-269 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа]; остатков 135-269 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа]; и остатков 135-269 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа]. В некоторых вариантах осуществления соответствующая область головки полипептида HA с отличимым профилем иммуногенности, который является преимущественно сезонным, содержит остатки 63-278, 125-277 или 135-269 из SEQ ID NO: 2 (полноразмерной последовательности для SMART_DO2A).

Полипептиды HA можно сконструировать таким образом, чтобы обеспечить конкретный профиль иммуногенного ответа. Иными словами, можно выбрать или наткнуться на различные стратегии разработки, применяемые для создания сконструированных полипептидов HA, для получения полипептидов HA, которые обеспечивают значительный иммунный ответ (например, ответ с выработкой нейтрализующих антител) против преимущественно циркулирующих сезонных (т.е. эндемичных) штаммов вируса гриппа и/или исторических или пандемических штаммов вируса гриппа. Таким образом, термин "сезонный профиль ответа" можно применять для описания рекомбинантного полипептида HA, который индуцирует выработку перекрестно нейтрализующих антител в большей степени против сезонных штаммов вируса гриппа, чем пандемических штаммов вируса гриппа. В большинстве случаев, сезонные штаммы гриппа можно определить как циркулирующие штаммы за период с 1986 по 2009 г. (включая последовательности штаммов 2009 г., которые не являются пандемическими) и другие штаммы, которые имеют практически сходные генетические последовательности, кодирующие антигенные области (т.е. сходные в пространстве антигенные последовательности). Конкретные примеры включают A/New Caledonia/20/1999 и A/Wisconsin/67/2005. Таким образом, "сезонный профиль ответа" можно применять для описания рекомбинантного полипептида HA, который индуцирует выработку перекрестно нейтрализующих антител против одного или более сезонных штаммов вируса гриппа, но не стандартного пандемического штамма A/California/07/2009. Аналогично, термин "пандемический профиль ответа" можно применять для описания рекомбинантного полипептида HA, который индуцирует выработку перекрестно нейтрализующих антител в большей степени против пандемических штаммов вируса гриппа, чем сезонных штаммов вируса гриппа; "пандемический профиль ответа" также можно применять для описания рекомбинантного полипептида HA, который индуцирует выработку перекрестно нейтрализующих антител против одного или более пандемических штаммов вируса гриппа, но не стандартного сезонного штамма A/New Caledonia/20/1999. В большинстве случаев, пандемические штаммы охватывают период с 2009 г. по настоящее время и образуют единый кластер антигенно сходных с A/California/07/2009 последовательностей. В более общем плане пандемические штаммы гриппа включают те, которые возникают в

результате реассортации (антигенного сдвига, происходящего примерно каждые 20-30 лет) между вирусами гриппа человека и птиц или свиней, что приводит к появлению вируса с новым НА птичьего или свиного происхождения, против которого у людей нет иммунитета. Иными словами, считается, что население является не подвергавшимся воздействию, не обладающим устойчивостью или обладающим незначительной устойчивостью либо в результате предшествующей вакцинации, либо предшествующего воздействия. Таким образом, пандемические штаммы включают A/South Carolina/01/1918 и A/New Jersey/1976, которые по последовательности и по антигенному расстоянию отличаются от кластера последовательностей California 2009. Пандемические подтипы включают, в частности, подтипы H5N1, H2N2, H9N2, H7N7, H7N3, H7N9 и H10N7.

Описанные в данном документе модификации можно применять для дополнительной адаптации или оптимизации профиля иммуногенности с тем, чтобы переконструировать сконструированный полипептид НА для обеспечения выработки антител против большего или меньшего количества сезонных штаммов (или демонстрации улучшенного ответа или ответа с большей выработкой антител к сезонным штаммам) или большего или меньшего количества пандемических штаммов (или демонстрации улучшенного ответа или ответа с большей выработкой антител к пандемическим штаммам). Таким образом, эти модификации расширяют иммунный профиль по кластерам последовательностей (или кладам) антигенно отличающихся штаммов. Их можно применять в отношении сконструированной рекомбинантной молекулы НА с тем, чтобы она обеспечивала иммунный ответ на новые пандемические штаммы, возникающие из-за антигенного сдвига (т.е. с тем, чтобы они охватывали антигенно отличающиеся штаммы, которые дистанционно разделены в пространстве генетической последовательности в расширенных временных рамках). Их также можно применять для направления генетических изменений, которые происходят за относительно короткие периоды времени, с тем, чтобы сконструированный полипептид НА продолжал оставаться эффективным, обеспечивая иммунный ответ на подвергнутые антигенному дрейфу циркулирующие сезонные штаммы (например, улучшенный ответ на сезонные штаммы). В конкретных вариантах осуществления описанные в данном документе модификации можно применять (1) для расширения охвата (т.е. способности обеспечивать нейтрализующий иммунный ответ) сконструированного полипептида НА, подобного пандемическому (т.е. пандемического профиля ответа), на один или более сезонных штаммов (т.е. более сезонный иммунный профиль); (2) для расширения охвата сконструированного полипептида НА, подобного сезонному, на любой пандемический штамм (для решения проблемы антигенного дрейфа); и (3) для расширения охвата полипептида НА, подобного сезонному, на любые другие антигенно отличающиеся сезонные штаммы (т.е. улучшенный сезонный иммунный профиль, который решает проблему антигенного сдвига).

Различные аспекты настоящего изобретения более подробно описаны в нижеследующих подразделах. Использование подразделов не подразумевает ограничение настоящего изобретения. Каждый подраздел можно применять в отношении любого аспекта настоящего изобретения. В изобретении использование "или" означает "и/или", если не указано иное.

Настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия можно варьировать. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, если не указано иное, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины и фразы имеют такое же значение, которое обычно понимается средним специалистом в данной области техники. Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в данном документе, теперь будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в данном документе публикации включены в данный документ посредством ссылки.

Для синтеза рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей можно применять стандартные методики (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и методики очистки можно выполнять в соответствии с техническими документами изготовителя или так, как их обычно выполняют в данной области техники или как описано в данном документе. Вышеупомянутые методики и процедуры обычно можно выполнять в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными из уровня техники и описанными в различных общих и более конкретных литературных источниках, которые упоминаются и рассматриваются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк (1989)), который включен в данный документ посредством ссылки для любой цели.

Сконструированные полипептиды НА.

Настоящее изобретение можно применять для модификации любых сконструированных полипептидов гемагглютинина (НА), включая любые полипептиды НА, полученные с применением различных рекомбинантных методик. Варианты осуществления настоящего изобретения можно применять к продуктам любого способа, применяемого специалистом в данной области техники для получения полипеп-

тидов НА с улучшенными свойствами с целью вакцинации. Применимые способы получения сконструированных полипептидов НА для применения в вариантах осуществления настоящего изобретения включают получение сконструированных полипептидов НА с помощью технологии оптимизированных вычислительными методами антигенов, обеспечивающих широкий спектр реактивности (COBRA), технологии создания мозаиков, "обратной генетики", белковой инженерии, комбинаций штаммов вируса гриппа на основе консенсусных последовательностей вируса гриппа, удаления и/или перестройки структурных доменов, замены доменов или комбинаций нейтрализующих или перекрестно-реактивных эпитопов, характерных для нескольких штаммов вируса гриппа. Такие предшествующие попытки включают описанные в 62/005670, WO 2012/177760, WO 2013/148164, US 20140147459, WO 2013/043729, US 20140286981, US 2014-0050759, US 8685410, WO 2015/028478, US 2010-0074915, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Однако данные технологии зачастую приводят к получению, преднамеренно или иным образом, полипептидов НА, которые характеризуются профилем иммуногенности, оказывающим влияние в отношении либо сезонных, либо пандемических штаммов. Профиль иммуногенности полипептида НА можно определить как спектр нейтрализующих антител, индуцированных посредством иммунизации с помощью полипептида НА. Обычно полипептид НА может характеризоваться сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем, пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем или сбалансированным иммунным профилем. Помимо прочего, настоящее изобретение можно применять для улучшения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА так, чтобы он был способен обеспечивать нейтрализующие антитела против как сезонных, так и пандемических штаммов вируса гриппа, или улучшать качество или количество нейтрализующих антител против сезонных и/или пандемических штаммов. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение можно применять для улучшения сконструированного полипептида НА так, чтобы он характеризовался сбалансированным профилем иммуногенности. Аналогично, варианты осуществления настоящего изобретения можно применять для изменения иммунного профиля полипептида НА со сбалансированным иммунным профилем так, чтобы он становился более или менее сезонным или более или менее пандемическим.

Как используется в данном документе, термин "нейтрализующие антитела" относится к молекулам иммуноглобулина, которые продуцируются В-лимфоцитами у людей или других животных в ответ на стимуляцию специфическим антигеном (иммуногеном). Например, нейтрализующие антитела могут индуцироваться полипептидом НА вируса гриппа. Нейтрализующие антитела, индуцированные специфическим полипептидом НА, обычно способны нейтрализовать (например, блокировать инфекционность) вирусы гриппа, содержащие данный специфический полипептид НА вируса гриппа, или вирусы гриппа, содержащие родственные полипептиды НА, которые имеют определенные общие иммуногенные признаки.

Как используется в данном документе, полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем представляет собой полипептид НА, который обеспечивает иммунный ответ (например, обеспечивает выработку нейтрализующих антител) против одного или более сезонных штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сезонных штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать 2 или более сезонных циркулирующих штамма вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с преимущественно сезонным иммунным профилем представляет собой полипептид НА, который обеспечивает выработку антител, которые не нейтрализуют пандемические штаммы гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые не нейтрализуют A/California/07/2009. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать большее количество или существенно большее количество сезонных штаммов вируса гриппа по сравнению с пандемическими штаммами гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать на по меньшей мере 2, 3, 4, 5 и т.д., на 6, 7, 8, 9 или 10 больше сезонных штаммов вируса гриппа, чем пандемических штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид НА с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем представляет собой полипептид НА, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать два или более сезонных циркулирующих штаммов, чем пандемических штаммов.

Как используется в данном документе, полипептид НА с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем представляет собой полипептид НА, который обеспечивает иммунный ответ (например, обеспечивает выработку нейтрализующих антител) против одного или более пандемических штаммов вируса гриппа. В частности, полипептид НА с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем представляет собой полипептид НА, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать A/California/07/2009. В некоторых вариантах

осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать один или более из A/California/07/2009, A/South Carolina/01/1918, A/New Jersey/1976 или любых других определенных в данном документе пандемических штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 и т.д. пандемических штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать два или более пандемических штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые не нейтрализуют сезонные штаммы гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые не нейтрализуют A/New Caledonia/20/1999. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать большее количество пандемических штаммов вируса гриппа по сравнению с сезонными штаммами гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать на по меньшей мере 2, 3, 4, 5 и т.д. больше пандемических штаммов вируса гриппа, чем сезонных штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с пандемическим или преимущественно пандемическим иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать на два или более пандемических штаммов, чем сезонных штаммов.

Как используется в данном документе, полипептид HA со сбалансированным иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать как сезонные, так и пандемические штаммы. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA со сбалансированным иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 сезонных штаммов (например, A/New Caledonia/20/1999), а также один или более из A/California/07/2009, A/South Carolina/01/1918, A/New Jersey/1976 или любых других описанных в данном документе пандемических штаммов. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA со сбалансированным иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 сезонных штаммов, а также A/California/07/2009. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA со сбалансированным иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать A/New Caledonia/20/1999 и A/California/07/2009. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA со сбалансированным иммунным профилем представляет собой полипептид HA, который обеспечивает выработку антител, которые способны нейтрализовать практически такое же количество сезонных и пандемических штаммов. Например, разница в количествах сезонных и пандемических штаммов, нейтрализуемых антителами, выработку которых обеспечивает полипептид HA со сбалансированным иммунным профилем, не превышает 1, 2, 3, 4 или 5.

Как используется в данном документе, фразы "улучшают профиль иммуногенности", "увеличивают широту иммунного профиля", "более сбалансированный иммунный профиль", "оказывающий меньшее влияние иммунный профиль", "более сезонный", "менее сезонный", "более пандемический", "менее пандемический" или грамматические эквиваленты указывают на спектр нейтрализующих антител, выработку которых индуцирует модифицированный полипептид HA, относительно спектра эталонного полипептида HA, такого как родительский полипептид HA до внесения описанных в данном документе модификаций.

Модификация сконструированного HA для изменения профиля иммуногенности.

Варианты осуществления настоящего изобретения можно применять для модификации или изменения профиля иммуногенности сконструированных полипептидов HA, в частности, для расширения разнообразия штаммов вируса гриппа, против которых сконструированный полипептид HA способен обеспечивать иммунный ответ (например, ответ с выработкой нейтрализующих антител). В некоторых вариантах осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением основан на модификациях, выведенных в результате анализа *in silico* варьирования последовательности среди циркулирующих штаммов вируса гриппа, картирования антигенной(ых) области(ей) и/или паттернов эпитопов и структурных анализов полипептида HA относительно полипептидов HA с различными или отличными иммунными профилями. Целенаправленные модификации можно вводить в различные местоположения аминокислотных остатков и/или конкретные области полипептида HA с известным иммунным профилем на основе соответствующих последовательностей, полученных из полипептида HA с отличимым иммунным профилем, с получением новых полипептидов HA с улучшенным и более сбалансированным иммунным профилем. Местоположение, тип и количество модификаций можно выбрать и комбинировать для получения переконструированного полипептида HA с профилем иммуногенности, который был адаптирован для обес-

печения конкретного иммунного ответа (например, сбалансированного иммунного профиля, улучшенного "более пандемического" ответа на пандемические штаммы и т.д.). В некоторых вариантах осуществления стратегия модификации разработана в целом для сохранения конкретных остатков сайта связывания с рецептором (RBS) полипептида HA хозяина с модификациями, сконструированными в области, находящейся вблизи RBS. Ниже описаны иллюстративные стратегии модификации.

Если не указано иное, конкретные положения для модификаций (например, аминокислотные замены, делеции или вставки) в целевом полипептиде HA определяют путем ссылки на последовательность полипептида HA A/California/07/2009 (H1N1), представленной ниже (согласно нумерации CA09).

```

MKAAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHN
GKCLKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLKKGNSYPKL
SKSYINDKGKEVLVLWGIIHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRX
XEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK
GAINSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVD
GWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIEN
LNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFE
FYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLV
VSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO:2)

```

Прививание сконструированной области головки.

В некоторых вариантах осуществления способ изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида HA основан на прививании имеющих определенную структуру областей глобулярной головки полипептида HA с известным иммунным профилем на стеблевые области полипептидов HA с отличимыми иммунными профилями. Например, способ в соответствии с настоящим изобретением может предусматривать выбор области головки сконструированного полипептида HA с известным иммунным профилем и замену выбранной областью головки сконструированного полипептида HA соответствующей области головки полипептида HA с отличимым профилем иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления выбранную область головки сконструированного полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем можно привить на стеблевые области полипептида HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем. И наоборот, в некоторых вариантах осуществления выбранную область головки сконструированного полипептида HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем можно привить на стеблевые области полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем.

В некоторых вариантах осуществления имеющие определенную структуру области глобулярной головки полипептида HA с известным иммунным профилем прививают на область полипептида HA с отличимым иммунным профилем, при этом область содержит стеблевую область плюс часть области головки полипептида HA с отличимым иммунным профилем. В других вариантах осуществления весь глобулярный домен HA с известным иммунным профилем прививают на стеблевую область молекулы HA с отличимым иммунологическим профилем. В большинстве случаев, подходящую для прививания область головки выбирают таким образом, чтобы обеспечить сохранение структурной целостности полученной полноразмерной гибридной молекулы. Обычно подходящая область головки выбрана таким образом, чтобы сохранить сайт связывания с рецептором (RBS) у полипептида HA. RBS у полипептида HA обычно можно определить как эпитоп, распознаваемый антителом CH65 (см., например, Whittle JR et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108:14216-21). В качестве альтернативы, RBS можно определить как участок, включающий все аминокислотные остатки в пределах 15 ангстремов от универсально консервативного триптофана, соответствующего положению 167 (согласно нумерации CA09) (например, см. Xu, R et al. Nat Struct Mol Biol. 2013 Mar; 20(3):363-70.) Подходящую область головки, содержащую или состоящую из RBS, можно выбрать для прививания на стеблевые реципиенты, основываясь на сохранении вторичной структуры, компактной глобулярной конфигурации отсоединенного RBS и сохранении граничных контактных участков при интеграции донорского RBS в реципиентную стеблевую молекулу. Неограничивающие примеры областей головки, выбранных из сконструированного полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем и подходящих для прививания, описаны в примере 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид HA с преимущественно сезонным иммунным профилем имеет аминокислотную последовательность, которая является практически идентичной последовательности, показанной из SEQ ID NO: 1.

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILED SHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
 YANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
 GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDKCCQTPQGAI
 NSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDG
 WYGYHNNQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMEN
 LNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFE
 FYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLL
 VSLGAISFWMCNGLQCRICI (SEQ ID NO:1)

В некоторых вариантах осуществления подходящая область головки выбрана таким образом, чтобы она содержала аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 63-278, 125-277 или 135-269 из SEQ ID NO:1. Как используется в данном документе, термин "соответствующий" используют для обозначения положения/идентичности аминокислотного остатка в полипептиде HA, представляющем интерес. Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что для простоты остатки в полипептиде HA обозначают с применением канонической системы нумерации на основе эталонного родственного полипептида так, что аминокислота, "соответствующая" остатку в положении 63, например, не обязательно должна представлять собой 63-ю аминокислоту в конкретной аминокислотной цепи, а скорее соответствует остатку, находящемуся в положении 63 в эталонном полипептиде; средний специалист в данной области техники легко поймет как выявить "соответствующие" аминокислоты с применением, например, различных инструментов для выравнивания последовательностей. В некоторых вариантах осуществления подходящая область головки может содержать аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной аминокислотным остаткам 63-278, 125-277 или 135-269 из SEQ ID NO: 1.

Затем выбранную область головки можно применять для замены или замещения соответствующей области головки полипептида HA с отличным иммунным профилем, т.е. пандемическим или преимущественно пандемическим. Такой подходящий полипептид HA с отличным иммунным профилем (т.е. пандемическим или преимущественно пандемическим) может являться встречающимся в природе или сконструированным, включая без ограничения полипептиды, сконструированные с помощью технологии оптимизированных вычислительными методами антигенов, обеспечивающих широкий спектр реактивности (COBRA), технологии создания мозаиков, "обратной генетики", белковой инженерии, комбинаций штаммов вируса гриппа на основе консенсусных последовательностей вируса гриппа, удаления и/или перестройки структурных доменов, замены доменов или комбинаций нейтрализующих или перекрестно-реактивных эпитопов, характерных для нескольких штаммов вируса гриппа.

Например, выбранную область головки можно применять для замены или замещения соответствующей области головки встречающегося в природе пандемического штамма, выбранной из остатков 63-277 SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа (последовательность HA A/California/07/2009)], остатков 63-277 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа], остатков 63-277 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа], остатков 125-277 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа], остатков 125-277 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа], остатков 125-277 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа], остатков 135-269 из SEQ ID NO: 2 [полноразмерная последовательность CA09 дикого типа], остатков 135-269 из SEQ ID NO: 3 [полноразмерная последовательность SC1918 дикого типа] или остатков 135-269 из SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность NJ1976 дикого типа].

В некоторых вариантах осуществления выбранную область головки можно применять для замены или замещения соответствующей области головки сконструированного полипептида HA с отличным профилем иммуногенности, который является преимущественно пандемическим. В качестве неограничивающего примера, сконструированный полипептид HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем имеет аминокислотную последовательность, которая является практически идентичной SEQ ID NO: 6.

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCCK
 LKGIAPLQLGKCSVAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSPDNGTCYPGYFADYEELREQL
 SSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNGVTASCPHAGAKSFYRNLLWLKKGNSYPKLSKSYIND
 KGKEVLVLWGVVHHPSTSADQQLYQNANA YVSVVTSRYSRRFTPEIAIRPKVRDQEGRMN
 YYWTLVEPGDTIIFEATGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITS DTPVHDCNTTCQTPQGAINSSLP
 FQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIA GFIEGGWTGMVDGWYGY
 HHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKK
 VDDGLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEYHK
 CNNTCMESVKNGTDYDPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLG
 AISFWMCSNGSLQCRICI.

Подходящая область головки выбрана таким образом, чтобы она содержала аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 63-278, 125-277 или 135-269 из SEQ ID NO: 6.

Модификации для удаления или конструирования предполагаемых сайтов N-гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления способ изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида HA основан на модификациях остатков, связанных с прогнозируемыми или предполагаемыми сайтами N-гликозилирования в области глобулярной головки полипептида HA. Обычно предполагаемые или прогнозируемые сайты N-гликозилирования определяются консенсусной последовательностью NxS/Ty, где x и y не представляют собой P. Сезонные полипептиды HA обычно содержат дополнительные сайты N-гликозилирования в области сайта связывания с рецептором (RBS) относительно пандемических полипептидов HA или полипептидов HA, подобных пандемическим. В целевом сезонном полипептиде HA или сконструированном полипептиде HA, подобном сезонному, можно подвергнуть мутации конкретные аминокислотные остатки для удаления сайтов гликозилирования и получения сконструированного полипептида HA с более пандемическим профилем гликозилирования. В конкретных вариантах осуществления в целевом сезонном полипептиде HA или сконструированном полипептиде HA, подобном сезонному, можно подвергнуть мутации или заменить конкретные аминокислотные остатки на остатки, наблюдаемые в соответствующих положениях у пандемических полипептидов HA или полипептидов HA, подобных пандемическим (например, California/07/2009) с тем, чтобы изменить профиль гликозилирования и профиль иммуногенности целевого полипептида HA таким образом, чтобы он являлся более пандемическим.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением предусматривает выявление наличия или отсутствия одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования в области головки сконструированного полипептида HA с известным иммунным профилем по сравнению с соответствующей областью головки полипептида HA с отличимым профилем иммуногенности; введение в область головки сконструированного полипептида HA одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования или встраивания дополнительных сайтов N-гликозилирования исходя из соответствующей последовательности полипептида HA с отличимым профилем иммуногенности.

В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок вводят в сконструированный полипептид HA с преимущественно сезонным иммунным профилем для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования с тем, чтобы изменить переконструированный полипептид HA таким образом, чтобы он являлся более пандемическим. И наоборот, в некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок вводят в сконструированный полипептид HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем для вставки одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования с тем, чтобы изменить переконструированный полипептид HA таким образом, чтобы он являлся на более сезонным.

В некоторых вариантах осуществления предполагаемые сайты N-гликозилирования удаляют или добавляют в область сайта связывания с рецептором (RBS) или вблизи нее. В некоторых вариантах осуществления предполагаемые сайты N-гликозилирования можно обнаружить в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6 или 5) ангстремов от сайта связывания с рецептором (RBS), при этом RBS определен как все аминокислотные остатки в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6 или 5) ангстремов от положения, соответствующего W167 (согласно нумерации CA09) в трехмерной (3D) структуре. В конкретных вариантах осуществления прогнозируемые сайты N-гликозилирования могут соответствовать положениям 142-145 и/или 177-179 (согласно нумерации CA09).

Таким образом, рекомбинантный полипептид HA, который обеспечивает сбалансированный иммунный профиль, можно получить посредством аминокислотной замены, разрушения или делеции с целью разрушения или удаления сайта N-гликозилирования в полипептиде HA с преимущественно сезонным иммунным профилем. В качестве альтернативы, рекомбинантный полипептид HA, который обеспечивает сбалансированный иммунный профиль, можно получить с помощью аминокислотных замен, разрушения или делеции с целью введения сайта N-гликозилирования в полипептид HA с преимущественно

пандемическим иммунным профилем. Примеры аминокислотных замен, разрушения или делеций, которые можно выполнять для получения рекомбинантного полипептида HA, который обеспечивает сбалансированный иммунный профиль, можно найти в табл. 4 или 5. Аминокислотные замены, разрушение или делеции можно получить из соответствующих областей циркулирующего штамма вируса гриппа.

Целевые замены или делеции в сайтах N-гликозилирования можно комбинировать с одной или более дополнительными модификациями. Например, положительно заряженные аминокислотные остатки можно вставить вблизи RBS для получения переконструированного полипептида HA с более пандемическим иммунным профилем. В конкретных вариантах осуществления сконструированный полипептид HA с сезонным или преимущественно сезонным иммунным профилем можно сделать таким, чтобы он характеризовался более пандемическим (например, более сбалансированным) иммунным профилем посредством вставок одной или более положительно заряженных аминокислот вблизи или рядом с одним или более предполагаемыми сайтами N-гликозилирования или в конформационных петлевых структурах, ограничивающих RBS (например, в "петлях 220 и 130"; см., например, Bradley, K.C. et al., *J. Virol.*, 2011, 85(23), 12387-12398). В некоторых вариантах осуществления в петлю или петли, ограничивающие RBS, вставляют остаток лизина или аргинина ("вставка лизина в петлю"). В некоторых вариантах осуществления вставки в петлю могут включать вставку лизина (K) или аргинина (R) в положения, соответствующие остатку 147 (согласно нумерации CA09) целевого сконструированного полипептида HA или вблизи них. Например, вставки в петлю могут включать вставку остатка лизина (K) или аргинина (R) в пределах 1-5 (например, в пределах 1-4, 1-3, 1-2 аминокислот) аминокислот от консенсусной последовательности NxS/Ty. В некоторых вариантах осуществления остаток лизина (K) или аргинина (R) находится в пределах 1-5 аминокислот (например, в пределах 1-4, 1-3, 1-2 аминокислот) в направлении 5' или 3' от консенсусной последовательности NxS/Ty.

Целевые модификации остатков в области RBS.

В некоторых вариантах осуществления изменение профиля иммуногенности сконструированного полипептида HA можно осуществить путем введения одной или более аминокислотных замен в область RBS или рядом с ней. Например, одну или более аминокислотных замен можно ввести в аминокислотные положения в пределах области, охватывающей остаток, соответствующие 60 и 291 (согласно нумерации CA09) целевого сконструированного полипептида HA. Одну или более аминокислотных замен также можно ввести в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5 и т.д.) ангстремов от сайта связывания с рецептором (RBS), при этом RBS определен как все аминокислотные остатки в пределах 15 (например, в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5 и т.д.) ангстремов от положения, соответствующего консервативному остатку W167 (согласно нумерации CA09) в трехмерной (3D) структуре. Например, в вариантах осуществления, где модификации присутствуют в пределах 10 ангстремов от RBS, они присутствуют в диапазоне 15-25 ангстремов от консервативного W167. В некоторых вариантах осуществления RBS может определяться эпитопом, связываемым нейтрализующим моноклональным антителом CH65 с широким спектром связывания (см., например, Whittle J.R. et al. *Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:14216-21). В таких вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен присутствуют рядом с (например, в пределах 100 аминокислотных остатков, в пределах 75 аминокислотных остатков, в пределах 50 аминокислотных остатков, в пределах 40 аминокислотных остатков, в пределах 30 аминокислотных остатков, в пределах 25 аминокислотных остатков, в пределах 20 аминокислотных остатков, в пределах 15 аминокислотных остатков, в пределах 10 аминокислотных остатков, в пределах 5 аминокислотных остатков и т.д.) эпитопом CH65 или в пределах 15 ангстремов от эпитопа CH65. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислотная замена предусматривает замещение аминокислотного остатка в конкретном положении аминокислотным остатком, наблюдаемым в соответствующем положении в полипептиде HA с отличимым профилем иммуногенности (например, циркулирующего сезонного или пандемического штамма вируса гриппа). Например, сконструированный полипептид HA с преимущественно сезонным иммунным профилем можно изменить таким образом, чтобы он являлся более пандемическим, путем замены аминокислот в конкретных положениях, основываясь на аминокислотных остатках, которые присутствуют в соответствующих положениях полипептида HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем. И наоборот, сконструированный полипептид HA с преимущественно пандемическим иммунным профилем можно изменить таким образом, чтобы он являлся более сезонным, путем замены аминокислот в конкретных положениях, основываясь на аминокислотных остатках, которые присутствуют в соответствующих положениях полипептида HA с преимущественно сезонным иммунным профилем.

Иллюстративные аминокислотные замены приведены в табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9. В качестве неограничивающих примеров, одна или более аминокислотных замен могут присутствовать в положениях целевого полипептида HA, соответствующих 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213, 214, 244, 245 и/или 262 (согласно нумерации CA09). В конкретных вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен могут присутствовать в положениях, соответствующих 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213 и/или 214 (согласно нумерации CA09). В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций предусматривают две или более, три или более,

четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более или десять или более модификаций, выбранных из тех, которые показаны в табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций могут включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных замен, выбранных из табл. 4, 5, 6, 7, 8 или 9.

Для изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида НА можно применять комбинацию различных описанных в данном документе способов. Например, целенаправленные модификации остатков в области RBS можно применять в комбинации с модификациями в предполагаемых сайтах N-гликозилирования и вставкой(ами) в петлю. Также можно применять прививание области головки в комбинации с целенаправленными модификациями остатков вокруг RBS и/или модификациями в предполагаемых сайтах N-гликозилирования и вставкой(ами) в петлю.

Оценка переконструированных полипептидов НА.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные рекомбинантные полипептиды НА, полученные в соответствии с различными описанными в данном документе способами, можно оценить на предмет необходимой экспрессии и конформации. Способы скрининга хорошо известны из уровня техники и включают анализы без использования клеток, анализы с использованием клеток и анализы с использованием животных. Анализы *in vitro* для детекции можно осуществить в отношении либо растворимой целевой молекулы, либо целевой молекулы в твердом состоянии, посредством ряда известных из уровня техники способов, включая применение метки или детектируемой группы, способной выявить сконструированный полипептид НА, который связан с целевой молекулой (например, иммуноглобулином). Выявляемые метки можно применять в сочетании с анализами с применением сконструированных полипептидов НА по настоящему изобретению. Например, описанный в данном документе рекомбинантный полипептид НА можно выбрать на основе характеристик экспрессии и конформационных характеристик, которые определяют посредством анализов, описанных в международной патентной заявке PCT/US2015/033205 под названием "Анализ экспрессии и конформационный анализ сконструированного гемагглютинаина вируса гриппа", поданной 29 мая 2015 г.

Настоящее изобретение предусматривает способы тестирования рекомбинантных полипептидов НА в соответствии с настоящим изобретением на животном-хозяине. Как используется в данном документе, "животное-хозяин" включает любую животную модель, подходящую для исследования гриппа. Например, животные-хозяева, подходящие для настоящего изобретения, могут представлять собой любых млекопитающих-хозяев, включая приматов, хорьков, кошек, собак, коров, лошадей, грызунов, таких как мыши, хомяки, кролики и крысы. В некоторых вариантах осуществления животное-хозяин, применяемое в целях настоящего изобретения, представляет собой хорька. В частности, в некоторых вариантах осуществления животное-хозяин является не подвергавшимся воздействию вируса или инфекции до введения связывающего средства в соответствии с настоящим изобретением (необязательно в композиции в соответствии с настоящим изобретением). В некоторых вариантах осуществления животное-хозяина инокулируют, инфицируют или иным образом подвергают контакту с вирусом до или одновременно с введением рекомбинантного полипептида НА в соответствии с настоящим изобретением. Животное-хозяина, применяемого при осуществлении на практике настоящего изобретения, можно инокулировать, инфицировать или иным образом подвергнуть контакту с вирусом любым способом, известным из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления животное-хозяина можно инокулировать, инфицировать или подвергнуть контакту с вирусом интраназально.

Модифицированные рекомбинантные полипептиды НА по настоящему изобретению также можно оценить в скрининговых анализах для выявления и/или отбора тех, которые могут обеспечивать выработку антител защитного (т. е. нейтрализующих) иммунного ответа против как сезонных, так и пандемических штаммов вируса гриппа у животного (например, мыши, хорька или человека). В конкретных вариантах осуществления обеспечение защитного иммунного ответа можно определить, например, с применением общеизвестного анализа ингибирования гемагглютинации (HAI) в качестве суррогатного показателя эффективности вакцины против вируса гриппа. Анализы HAI могут предусматривать применение эритроцитов курицы, индейки или лошади для детекции антител, специфичных к H1N1. В конкретных вариантах осуществления защитные иммунные ответы демонстрируются появлением среднего HAI-титра, превышающего 1:40, который коррелирует с предупреждением и уменьшением болезни, вызванной вирусом гриппа. HAI-титры антител, составляющие примерно от 1:32 до 1:40, обычно будут защищать от инфицирования приблизительно 50% субъектов после иммунизации с помощью инактивированной вакцины против вируса гриппа человека. См. Treanor, J. & Wright, P.F. Immune correlates of protection against influenza in the human challenge model. *Dev. Biol. (Basel)*, 2003, 115:97-104; включенную в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления обеспечение защитного иммунного ответа можно выявить по показателям конверсии сыворотки. Защитный уровень конверсии сыворотки можно определить как по меньшей мере 4-кратное повышение HAI-титра, например, HAI-титра до введения или вакцинации, составляющего менее 1:10, и титра после вакцинации, превышающего или равного 1:40. Иными словами, успешные показатели конверсии сыворотки можно определить как процент субъектов либо с HAI-титром до вакцинации менее приблизительно 1:10 и HAI-титром после вакцинации, превышающим приблизительно 1:40, либо с HAI-титром до вакцинации, превышающим при-

близительно 1:10, и минимальным четырехкратным повышением HAI-титра антител после вакцинации.

Не подвергавшихся воздействию и/или инокулированных животных можно применять для любого из ряда исследований. Например, такие животные модели можно применять для исследований передачи вируса, как известно в данной области техники. Предполагается, что использование хорьков в исследованиях передачи вируса может служить надежным прогностическим фактором передачи вируса у людей. Например, из уровня техники известна передача вируса гриппа по воздуху от инокулированных животных (например, хорьков) не подвергавшихся воздействию животным (Tumpey et al., 2007, Science 315; 655-59; включена в данный документ посредством ссылки). Исследования передачи вируса можно применять для тестирования рекомбинантных полипептидов HA в соответствии с настоящим изобретением. Например, рекомбинантные полипептиды HA в соответствии с настоящим изобретением можно вводить подходящему животному-хозяину для определения эффективности указанного сконструированного полипептида HA в отношении обеспечения широкого иммунного ответа у животного-хозяина. С применением информации, собранной в результате исследований на животных-хозяевах, специалист в данной области техники может прогнозировать эффективность рекомбинантного полипептида HA в отношении обеспечения широкой защиты у человека-хозяина.

Конструкция и экспрессия нуклеиновых кислот.

Описанные в данном документе рекомбинантные полипептиды HA вируса гриппа можно получить из молекул нуклеиновой кислоты с применением известных из уровня техники молекулярно-биологических способов. Молекулы нуклеиновой кислоты вставляют в вектор, который способен экспрессировать полипептиды HA при введении в соответствующую клетку-хозяина. Соответствующие клетки-хозяева включают без ограничения клетки бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Для построения векторов экспрессии, кодирующих слитые белки по настоящему изобретению, под контролем сигналов контроля транскрипции/трансляции можно применять любой из способов, известных специалисту в данной области техники, для вставки фрагментов ДНК в вектор. Данные способы могут включать *in vitro* методики с использованием рекомбинантной ДНК и методики синтеза, а также комбинацию *in vivo* (см. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al., Greene Publ. Assoc, Wiley-Interscience, Нью-Йорк).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает нуклеиновые кислоты, которые кодируют полипептид HA или характерную или биологически активную часть полипептида HA. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает нуклеиновые кислоты, которые комплементарны нуклеиновым кислотам, которые кодируют полипептид HA или характерную или биологически активную часть полипептида HA.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются с нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептид HA или характерную или биологически активную часть полипептида HA. Такие нуклеиновые кислоты можно применять, например, в качестве праймеров или в качестве зондов. В качестве лишь нескольких примеров, такие нуклеиновые кислоты можно применять в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР), в качестве зондов для гибридизации (в том числе гибридизации *in situ*) и/или в качестве праймеров для ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК или РНК и могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением могут включать один или более неприродных нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением включают только природные нуклеотиды.

Экспрессию молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением можно регулировать с помощью второй последовательности нуклеиновой кислоты так, чтобы молекула экспрессировалась в хозяине, трансформированном с помощью рекомбинантной молекулы ДНК. Например, экспрессию молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно контролировать посредством известных из уровня техники промоторного и/или энхансерного элементов.

Конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению вставляют в вектор экспрессии или вирусный вектор посредством известных из уровня техники способов и при этом молекулы нуклеиновой кислоты функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии.

Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, трансформируют в подходящую клетку-хозяина для обеспечения продуцирования белка, кодируемого конструкциями нуклеиновой кислоты. Иллюстративные клетки-хозяева включают прокариотов (например, *E.coli*) и эукариотов (например, клетку COS, 293 или CHO). Клетки-хозяева, трансформированные с помощью вектора экспрессии, выращивают в условиях, обеспечивающих продуцирование сконструированного полипептида HA по настоящему изобретению с последующим извлечением сконструированного полипептида HA.

Рекомбинантные полипептиды HA по настоящему изобретению можно очистить с помощью любой известной из уровня техники методики. Например, без привязки к какой-либо теории, сконструированные полипептиды HA можно извлечь из клеток либо в виде растворимых полипептидов, либо в виде телец включения, из которых их можно количественно экстрагировать с помощью 8 М гидрохлорида гуа-

нидия и диализа. Для дополнительной очистки рекомбинантных полипептидов НА по настоящему изобретению можно применять традиционную ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию с обращенной фазой или гель-фильтрацию. Рекомбинантные полипептиды НА по настоящему изобретению также можно извлечь из кондиционированных сред после секреции из эукариотических или прокариотических клеток.

Вирусоподобные частицы (VLP) на основе вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает вирусоподобные частицы (VLP) на основе вируса гриппа, включающие описанный в данном документе модифицированный рекомбинантный полипептид НА. В некоторых вариантах осуществления VLP на основе вируса гриппа в целом составлены из НА, NA и вирусных структурных (например, gag HIV) белков. Получение VLP на основе вируса гриппа известно из уровня техники и будет легко понятно специалисту в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия. Например, VLP на основе вируса гриппа можно получить путем трансфекции клеток-хозяев с помощью плазмид, кодирующих белки НА, NA и gag HIV. В качестве одного примера, подходящая клетка-хозяин включает клетку человека (например, HEK293T). После инкубирования трансфицированных клеток в течение соответствующего времени, обеспечивающего экспрессию белка (такого как в течение примерно 72 ч), VLP можно выделить из надосадочных жидкостей культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе VLP на основе вируса гриппа можно применять в качестве вакцин против вируса гриппа чтобы обеспечить иммунный ответ с широким спектром нейтрализации на вирусы гриппа H1N1.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, включающие описанный в данном документе модифицированный рекомбинантный полипептид НА и/или родственные ему молекулы. Например, в некоторых вариантах осуществления в фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением включены модифицированные рекомбинантные полипептиды НА, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды, характерные или биологически активные фрагменты таких полипептидов или нуклеиновых кислот, антитела, которые связываются и/или конкурируют с такими полипептидами или фрагментами, малые молекулы, которые взаимодействуют или конкурируют с такими полипептидами или гликанами, которые связываются с ними, и т.д.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения или лечения инфекций гриппа путем введения таких фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят субъекту, страдающему от инфекции гриппа или восприимчивому к ней. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, включая без ограничения, птиц (например, кур, уток, индеек и т.д.), собак, лошадей и свиней. В некоторых вариантах осуществления субъект считается страдающим от инфекции гриппа, если субъект демонстрирует один или более симптомов, обычно ассоциируемых с инфекцией гриппа. В некоторых вариантах осуществления известно или предположительно субъект имел контакт с вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления субъект считается восприимчивым к инфекции гриппа, если известно или предположительно субъект имел контакт с вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления известно или предположительно субъект имел контакт с вирусом гриппа, если субъект входил в контакт с другими индивидуумами, которые известно или предположительно инфицированы вирусом гриппа, и/или если субъект находится или присутствовал в месте, в котором известно или предположительно широко распространена инфекция гриппа.

В некоторых вариантах осуществления субъектов, страдающих от инфекции гриппа или восприимчивых к ней, тестируют на антитела к модифицированным рекомбинантным полипептидам НА в соответствии с настоящим изобретением до, во время или после введения фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления субъектам, имеющим такие антитела, не вводят фармацевтические композиции, содержащие модифицированные рекомбинантные полипептиды НА в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления соответствующая доза фармацевтической композиции и/или модифицированного рекомбинантного полипептида НА выбрана на основе результатов детекции таких антител (или их отсутствия).

В некоторых вариантах осуществления выбор конкретного субъекта для лечения, конкретного модифицированного рекомбинантного полипептида НА или композиции для введения и/или конкретной дозы или режима введения документально фиксируют, например, в письменном, печатном или электронном виде для хранения.

Композиции, содержащие описанный модифицированный рекомбинантный полипептид НА, можно вводить до или после развития одного или более симптомов инфекции гриппа. В некоторых вариантах осуществления VLP на основе вируса гриппа, содержащие описанный в данном документе модифицированный рекомбинантный полипептид НА (или сам по себе модифицированный рекомбинантный полипептид НА), можно вводить до или после развития одного или более симптомов инфекции гриппа.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает лечение инфекций гриппа путем введения описанных в данном документе модифицированных рекомбинантных полипеп-

тидов HA. В некоторых вариантах осуществления лечение инфекций гриппа в соответствии с настоящим изобретением осуществляют путем введения VLP на основе вируса гриппа, содержащей описанный в данном документе модифицированный рекомбинантный полипептид HA. В некоторых вариантах осуществления лечение инфекций гриппа в соответствии с настоящим изобретением осуществляют путем введения вакцины. На сегодняшний день, хотя были достигнуты значительные успехи в разработке вакцин против вируса гриппа, есть возможности для дальнейшего улучшения. Настоящее изобретение предусматривает вакцины, содержащие модифицированные рекомбинантные полипептиды HA в соответствии с настоящим изобретением и, в частности, содержащие сконструированные полипептиды HA, которые обеспечивают иммунные ответы с широким спектром защиты на множественные нейтрализующие антигенные детерминанты (например, эпитоп) модифицированных рекомбинантных полипептидов HA.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает описанные в данном документе VLP на основе вируса гриппа, вакцину против вируса гриппа, слитый белок и/или модифицированный рекомбинантный полипептид HA для профилактики гриппа.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает иммуногенные композиции (например, вакцины) и введение данных иммуногенных композиций субъекту-человеку. В конкретных вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет от 6 месяцев или старше, от 6 месяцев до 35 месяцев, от 36 месяцев до 8 лет или от 9 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции представляют собой фармацевтические композиции, содержащие одно или более из следующего: (1) инактивированный вирус, (2) живой аттенуированный вирус гриппа, например вирус с дефектной репликацией, (3) вирусоподобные частицы (VLP), (4) модифицированный рекомбинантный полипептид HA, (5) нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный рекомбинантный полипептид HA или его характерную или биологически активную часть, (6) ДНК-вектор, который кодирует модифицированный рекомбинантный полипептид HA в соответствии с настоящим изобретением или его характерную или биологически активную часть, и/или (7) систему экспрессии, например клетки, экспрессирующие один или более белков гриппа для применения в качестве антигенов.

Цельные вирусы гриппа, содержащие описанные в данном документе сконструированные и переконструированные полипептиды HA, можно получить посредством обратной генетики на основе плазмид (см., например, Neumann, G. et al., *Reverse Genetics of Influenza Viruses*, *Methods Mol Biol.*, 2012, 865:193-206; включенной в настоящий документ посредством ссылки) и технологий на основе зародышей; например, рекомбинантный вирус, содержащий описанный в данном документе оптимизированный вычислительными методами полипептид HA H1N1, полипептид NA дикого типа из штамма вируса гриппа H1N1 и остов генов внутренних белков из вируса-донора (например, гриппа A/Puerto Rico/8/34 (PR8)), который обеспечивает высокий выход в зародышах. Например, шесть плазмид, кодирующих внутренние белки быстрорастущего вируса-донора гриппа A/Puerto Rico/8/34 (PR8), можно совместно трансфицировать с двумя плазмидами, кодирующими описанный в данном документе оптимизированный вычислительными методами полипептид HA H1N1 и гликопротеин нейраминидазы (NA) дикого типа, в подходящие клетки млекопитающих (например, клетки Vero) с последующим выделением рекомбинантного вируса. Специалисту в данной области техники будет понятно, что также можно применять системы обратной генетики с 12 плазмидами (см., например, Pkosz, A. et al. *Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: Closing the circle*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 884-8806). Рекомбинантные вирусы, содержащие гены внутренних белков из вируса PR8, можно применять для получения инактивированных вакцин против вируса гриппа (см., например, Fodor, E. et al. *Rescue of influenza A virus from Recombinant DNA*. *J. Virol.*, 1999, 73, 9679-9682; включенную в данный документ посредством ссылки). Цельные вирусы гриппа можно вводить в качестве компонентов живой аттенуированной или инактивированной посредством расщепления вакциной.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает инактивированные вакцины против вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления инактивированные вакцины против вируса гриппа содержат один из трех типов антигенного препарата: инактивированный цельный вирус, субвирионы, в которых очищенные вирусные частицы разрушены с помощью детергентов или других реагентов для солюбилизации липидной оболочки ("расщепленная" вакцина), или очищенный полипептид HA ("субъединичная" вакцина). В некоторых вариантах осуществления вирус можно инактивировать посредством обработки с помощью формальдегида, бета-пропиолактона, эфира, эфира с детергентом (таким как TWEEN-80®), цетилтриметиламмония бромида (СТАВ) и тритона N101, дезоксихолата натрия и три(н-бутил)фосфата. Инактивацию можно проводить после или до очистки аллантоисной жидкости (от вируса, продуцируемого в зародышах); вирионы выделяют и очищают посредством центрифугирования (Nicholson et al., eds., 1998, *Textbook of Influenza*, Blackwell Science, Малден, Массачусетс; включена в данный документ посредством ссылки). Для оценки специфической активности вакцины можно применять тест посредством одномерной радиальной иммунодиффузии (SRD) (Schild et al., 1975, *Bull. World Health Organ.*, 52:43-50 & 223-31; Mostow et al., 1975, *J. Clin. Microbiol.*, 2:531; обе из которых включены в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные или переконструированные полипептиды HA по настоящему изобретению применяют в качестве компонента вакцин против сезонного и/или

пандемического гриппа или в качестве части режима вакцинации против вируса гриппа, предназначенного для придания долгосрочной (многосезонной) защиты.

В некоторых вариантах осуществления вирус гриппа для применения в вакцинах выращивают в зародышах, например, в куриных яйцах с зародышем, и в этом случае собранный материал представляет собой аллантоисную жидкость. В качестве альтернативы или дополнительно, вирус гриппа или сконструированные/переконструированные полипептиды гемагглютинина можно получить любым способом с применением культуры ткани для выращивания вируса. Подходящие клеточные субстраты для выращивания вируса или иного рекомбинантного получения сконструированных или переконструированных полипептидов гемагглютинина включают, например, клетки почки собаки, такие как MDCK, или клетки из клона MDCK, MDCK-подобные клетки, клетки почки обезьяны, такие как клетки AGMK, включая клетки Vero, культивируемые эпителиальные клетки в виде непрерывных линий клеток, клетки 293T, клетки BK-21, клетки CV-1 или любые другие типы клеток млекопитающих, подходящие для продуцирования вируса гриппа (включая эпителиальные клетки верхних дыхательных путей) с целью получения вакцин, которые легко доступны из коммерческих источников (например, ATCC, Rockville, Md.). Подходящие клеточные субстраты также включают клетки человека, такие как клетки MRC-5. Подходящие клеточные субстраты не ограничены линиями клеток; например, также включены зародышевые клетки, такие как фибробласты зародыша цыпленка.

Сконструированные или переконструированные полипептиды гемагглютинина также можно экспрессировать/получить в различных системах экспрессии на основе эукариотических клеток, включая клетки микроводорослей (например, *Schizochytrium* sp.; см., например, Bayne, A.-C.V. et al., PLOS ONE, 8(4):e61790, апрель 2013), системах на основе клеток растений (например, растений табака; см., например, Jul-Larsen, A. et al., Hum Vaccin Immunother., 8(5):653-61, 2012), дрожжей (см., например, Athamam, T.N. et al., Virol J., 8:524, 2011) и грибов (см., например, Allgaier, S. et al., Biologicals, 37:128-32, 2009). Системы экспрессии на основе клеток бактерий также охватываются настоящим изобретением (см., например, Davis, A.R. et al., Gene, 21:273-284, 1983).

В некоторых вариантах осуществления вакцины в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат один или более адъювантов. В качестве адъювантов в вакцинах для человека можно применять, например, соли алюминия (Baylor et al., 2002, Vaccine, 20:S18; включена в данный документ посредством ссылки) и монофосфорилипид А (MPL; Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., Нью-Йорк, р. 407; включена в данный документ посредством ссылки). В качестве альтернативы или дополнительно, в качестве адъювантов в вакцинах для человека в настоящее время проходят испытания новые соединения, такие как MF59 (Chiron Corp., <http://www.chiron.com/investors/pressreleases/2005/051028.html>). CPG 7909 (Cooper et al., 2004, Vaccine, 22:3136; включена в данный документ посредством ссылки) и сапонины, такие как QS21 (Ghochikyan et al., 2006, Vaccine, 24:2275; включена в данный документ посредством ссылки).

Кроме того, некоторые адъюванты, известные из уровня техники, такие как поли[ди(карбоксилатофенокси)фосфазен] (PCCP; Payne et al., 1998, Vaccine, 16:92; включена в данный документ посредством ссылки), интерферон- γ (Cao et al., 1992, Vaccine, 10:238; включена в данный документ посредством ссылки), блок-сополимер P1205 (CRL1005; Katz et al., 2000, Vaccine, 18:2177; включена в данный документ посредством ссылки), интерлейкин-2 (IL-2; Mbwuikie et al., 1990, Vaccine, 8:347; включена в данный документ посредством ссылки) и полиметилметакрилат (PMMA; Kreuter et al., 1981, J. Pharm. Sci., 70:367; включена в данный документ посредством ссылки), усиливают иммуногенность вакцин против вируса гриппа.

Кроме иммуногенных композиций (например, вакцин, содержащих описанные в данном документе VLP со сконструированными или переконструированными полипептидами гемагглютина гриппа), настоящее изобретение предусматривает другие терапевтические композиции, применимые в лечении вирусных инфекций. Терапевтические композиции включают, например, VLP на основе вируса гриппа, слитые белки и сам по себе описанный в данном документе сконструированный или переконструированный полипептид HA. В некоторых вариантах осуществления лечение осуществляют путем введения средства, которое препятствует экспрессии или активности полипептида HA.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе иммуногенные композиции (например, VLP на основе вируса гриппа или сами по себе сконструированные/переконструированные полипептиды HA) вводят отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими средствами для усиления иммунного ответа. Например, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе VLP на основе вируса гриппа можно вводить с адъювантом, таким как неполный адъювант Фрейнда или полный адъювант Фрейнда. В некоторых вариантах осуществления в качестве биологических адъювантов можно применять один или более цитокинов, таких как IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α или IFN- γ , один или более факторов роста, таких как GM-CSF или G-CSF; одну или более молекул, таких как OX-40L или 41 BBL, или комбинации данных молекул (например, Salgaller et al., 1998, J. Surg. Oncol. 68(2):122-38; Lotze et al., 2000, Cancer J. Sci. Am. 6(Suppl 1):S61-6; Cao et al., 1998, Stem Cells 16(Suppl 1):251-60; Kuiper et al., 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465:381-90).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие антитела или другие средства, родственные предусмотренным полипептидам НА. Например, настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие антитела, которые распознают вирусные частицы, содержащие конкретный сконструированный или переконструированный полипептид НА, нуклеиновые кислоты (такие как последовательности нуклеиновых кислот, комплементарные последовательностям НА, которые можно применять для RNAi), гликаны, которые конкурируют за связывание с рецепторами НА, малые молекулы или гликомиметики, которые конкурируют за взаимодействие гликана и полипептида НА, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления применяют совокупности различных средств, имеющих разнообразные структуры. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции содержат одно или более мультиспецифичных средств. В некоторых вариантах осуществления лечение предусматривает срочное введение вскоре после контакта или подозрения на контакт.

В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе иммуногенных композиций (например, вакцин) обеспечивает широкую перекрестную защиту от различных форм вирусов гриппа. Например, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе иммуногенные композиции обеспечивают перекрестную защиту от вирусов гриппа А птиц, свиней и/или человека. В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе иммуногенных композиций обеспечивает перекрестную защиту от одного или более подтипов гриппа А. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе иммуногенные композиции обеспечивают перекрестную защиту от множества штаммов вирусов гриппа А подтипа H1 (см., например, фиг. 4 и 5).

В большинстве случаев, иммуногенная и/или фармацевтическая композиция будет включать терапевтическое средство в дополнение к одному или более неактивным средствам, таким как стерильный биосовместимый носитель, включая без ограничения стерильную воду, солевой раствор, буферный солевой раствор или раствор декстрозы. В качестве альтернативы или дополнительно, композиция может содержать любую из множества добавок, таких как стабилизаторы, буферы, вспомогательные вещества (например, сахара, аминокислоты и т.п.) или консерванты.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические композиции включают терапевтически эффективное количество VLP на основе вируса гриппа (содержащей описанный в данном документе сконструированный или переконструированный полипептид НА) отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения солевой раствор, буферный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления носитель и композиция являются стерильными, а состав подходит для способа введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или буферных средств для регуляции pH. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, пилюлю, капсулу, состав с замедленным высвобождением или порошок. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутрискожной инъекции, интраназального введения или внутримышечной инъекции. Можно применять любой из общеизвестных фармацевтических носителей, таких как стерильный солевой раствор или кунжутное масло. В некоторых вариантах осуществления среда также может содержать традиционные фармацевтические вспомогательные вещества, такие как, например, фармацевтически приемлемые соли для регулирования осмотического давления, буферы, консерванты и т.п. В некоторых вариантах осуществления другие среды, которые можно применять с композициями и способами, представленными в данном документе, представляют собой физиологический раствор и кунжутное масло.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство, присутствующее в фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, будет состоять из одного или более описанных в данном документе сконструированных или переконструированных полипептидов НА.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция будет включать терапевтическое средство, которое инкапсулировано, захвачено или заключено в липидную везикулу, биодоступную и/или биосовместимую и/или биоразлагаемую матрицу или другую микрочастицу. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная или фармацевтическая композиция содержит наночастицы, содержащие на своей поверхности описанные в данном документе сконструированные или переконструированные полипептиды гемагглютинина. В некоторых вариантах осуществления наночастицы представляют собой ферритиновые наночастицы (см., например, публикацию предварительной заявки на патент США 2014/0072958).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в комбинации с одним или более другими терапевтическими средствами, включая без ограничения вакцины и/или антитела. Под "в комбинации с" не подразумевается, что средства должны вводить одновременно или в составе для совместной доставки, хотя данные способы доставки подпадают под объем настоящего изобретения. В большинстве случаев, каждое средство будут вводить в дозе и в соответствии с графиком, установленными для данного средства. Кроме того, настоящее изобретение охватывает дос-

тавку фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением в комбинации со средствами, которые могут улучшать их биодоступность, замедлять или модифицировать их метаболизм, подавлять их выведение или модифицировать их распределение в организме. Хотя фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения (например, вакцинации) любого нуждающегося в этом субъекта (например, любого животного), наиболее предпочтительно применять их в лечении людей. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением и/или описанные в данном документе сконструированные или переконструированные полипептиды НА вводят в комбинации с одним или более противовирусными средствами (например, озельтамивиром [TAMIFLU®], занамавиром [RELEZA®] и т.д.) и/или сиалидазой.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями, включая пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, подкожный, внутрижелудочковый, чрескожный, внутрикожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (как посредством порошков, мазей, кремов или капель), мукозальный, назальный, трансбуккальный, энтеральный, сублингвальный; путем интратрахеальной инстилляцией, бронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией; и/или в виде перорального спрея, назального спрея и/или аэрозоля. В большинстве случаев, наиболее подходящий путь введения будет зависеть от ряда факторов, включая природу средства (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта), состояние пациента (например, способен ли пациент переносить пероральное введение) и т.д.

В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение, такое как подкожное, внутривенное или внутримышечное введение, осуществляют посредством инъекции. В некоторых вариантах осуществления инъекционные препараты получают в традиционных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. В некоторых вариантах осуществления инъекционные растворы и суспензии получают из стерильных порошков, гранул и др. В некоторых вариантах осуществления введение описанной в данном документе VLP на основе вируса гриппа является системным или местным.

В некоторых вариантах осуществления VLP на основе вируса гриппа или их композиции вводят любым подходящим способом, таким как с помощью фармацевтически приемлемых носителей. Специалисту в данной области техники известно, что фармацевтически приемлемые носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов описанных в данном документе фармацевтических композиций.

В некоторых вариантах осуществления препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Иллюстративные неводные растворители включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Иллюстративные водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и буферные среды. В некоторых вариантах осуществления среды-носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. В некоторых вариантах осуществления среды-носители для внутривенного введения включают добавки жидкости и питательных веществ, добавки электролитов (такие как на основе декстрозы Рингера) и т.п. В некоторых вариантах осуществления также могут присутствовать консерванты и/или другие добавки. Иллюстративные консерванты и/или другие добавки включают противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие средства и инертные газы и т.п.

В некоторых вариантах осуществления композиции (содержащие описанный в данном документе полипептид НА в виде VLP на основе вируса гриппа или в ином виде) вводят в виде фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты или основания, образованной в результате реакции с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, хлорная кислота, азотная кислота, тиоциановая кислота, серная кислота и фосфорная кислота, и органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота и фумаровая кислота, или в результате реакции с неорганическим основанием, таким как гидроксид натрия, гидроксид аммония, гидроксид калия, и органическими основаниями, такими как моно-, ди-, триалкил- и ариламины и замещенные этаноламины.

В настоящее время для доставки терапевтических средств непосредственно в легкие и дыхательную систему чаще всего используют пероральный или назальный путь введения спрея или аэрозоля (например, путем ингаляции). Однако настоящее изобретение охватывает доставку фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением любым подходящим путем, принимая во внимание вероятные достижения в области доставки лекарственных средств.

В некоторых вариантах осуществления препараты для ингаляционной или аэрозольной доставки содержат множество частиц. В некоторых вариантах осуществления такие препараты характеризуются средним размером частиц, составляющим приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизи-

тельно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12 или приблизительно 13 микрон. В некоторых вариантах осуществления препараты для ингаляционной или аэрозольной доставки составлены в виде сухого порошка. В некоторых вариантах осуществления препараты для ингаляционной или аэрозольной доставки составлены в виде влажного порошка, например, путем включения смачивающего средства. В некоторых вариантах осуществления смачивающее средство выбрано из группы, состоящей из воды, солевого раствора или другой жидкости с физиологическим значением pH.

В некоторых вариантах осуществления композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят в виде капель в носовую полость или полость рта. В некоторых вариантах осуществления доза может содержать множество капель (например, 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1-5 и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с применением устройства, которое доставляет отмеренную дозу композиции (например, сконструированного или переконструированного полипептида НА).

Подходящие устройства для применения при доставке описанных в данном документе фармацевтических композиций для внутрикожного введения включают устройства с короткой иглой, такие как описанные в патенте США № 4886499, патенте США № 5190521, патенте США № 5328483, патенте США № 5527288, патенте США № 4270537, патенте США № 5015235, патенте США № 5141496, патенте США № 5417662 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Композиции для внутрикожного введения также можно вводить с помощью устройств, которые ограничивают эффективную длину проникновения иглы в кожу, таких как описанные в WO 1999/34850, включенной в данный документ посредством ссылки, и их функциональных эквивалентов. Также подходят устройства для безыгольного впрыскивания, которые доставляют жидкие вакцины в дерму посредством жидкоструйного инжектора или посредством иглы, которая прокалывает роговой слой и создает струю, которая достигает дермы. Устройства для безыгольного впрыскивания описаны, например, в патенте США № 5480381, патенте США № 5599302, патенте США № 5334144, патенте США № 5993412, патенте США № 5649912, патенте США № 5569189, патенте США № 5704911, патенте США № 5383851, патенте США № 5893397, патенте США № 5466220, патенте США № 5339163, патенте США № 5312335, патенте США № 5503627, патенте США № 5064413, патенте США № 5520639, патенте США № 4596556, патенте США № 4790824, патенте США № 4941880, патенте США № 4940460, WO 1997/37705 и WO 1997/13537 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Также подходят баллистические устройства для доставки порошка/частиц, в которых используется сжатый газ для ускоренного введения вакцины в форме порошка через внешние слои кожи в дерму. Кроме того, в классическом способе внутрикожного введения по Манту можно применять традиционные шприцы.

Общие соображения по составлению и изготовлению фармацевтических средств можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; включенном в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в любой дозе, подходящей для достижения требуемого результата. В некоторых вариантах осуществления требуемый результат представляет собой индукцию длительного адаптивного иммунного ответа на множество штаммов вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления требуемый результат представляет собой снижение интенсивности, тяжести, и/или частоты, и/или задержки проявления одного или более симптомов инфекции гриппа.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят в виде одной или множества доз. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят в виде множества доз, вводимых в разные дни (например, прайм-буст стратегии вакцинации). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят в соответствии с непрерывным режимом дозирования, так чтобы между периодами терапевтического дозирования у субъекта не было периодов, которые меньше терапевтического дозирования. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят в соответствии с режимом прерывистого дозирования, так чтобы между двумя периодами терапевтического дозирования у субъекта был по меньшей мере один период, который меньше терапевтического дозирования.

В некоторых вариантах осуществления вводимая субъекту доза должна являться достаточной, чтобы индуцировать полезный терапевтический ответ у субъекта с течением времени, или подавлять, или предупреждать инфекцию, вызванную вирусом гриппа H1N1. Требуемая доза будет варьировать для разных субъектов в зависимости от вида, возраста, веса и общего состояния субъекта, тяжести подвергаемой лечению инфекции, конкретной применяемой композиции и способа ее введения.

Более полное понимание настоящего изобретения будет достигаться при обращении к нижеследующим примерам. Все цитируемые литературные источники включены посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Прививание сайтов связывания с рецептором улучшает сезонный иммунный профиль (силу связывания) сконструированного полипептида НА.

В данном примере описана структура и тестирование сконструированных полипептидов НА, кото-

рые характеризуются увеличенной шириной в отношении иммунологического профиля, путем прививания области глобулярной головки белка HA вируса гриппа, включая RBS, на стеблевые области HA реципиента. Имеющие определенную структуру области глобулярной головки полипептида HA, характеризующиеся сезонным иммунным профилем, прививали на стеблевые области молекул HA из штаммов, подобных пандемическим (New Jersey/1976, South Carolina/1918, California/07/2009 и нового сконструированного пандемического HA). В отношении прививания тестировали три различные области глобулярной головки HA (определенные как RBS 00, RBS 01 и RBS 02, фиг. 1).

Для целей данного примера три RBS-содержащие области, применяемые для прививания, определяли как G63-G277 (согласно нумерации CA09), V125-G277 (согласно нумерации CA09) и P135-P269 (согласно нумерации CA09). Данные области RBS, выбранные для прививания, выбирали на основе критериев, в соответствии с которыми они будут вызывать минимальное разрушение всей укладки белка при отсоединении RBS от остальной части молекулы HA. Более конкретно, области RBS выбирали таким образом, чтобы (i) начальное и конечное положения были расположены в петлевых областях, ограничивающих RBS, что помогло бы сохранить локальную вторичную структуру, (ii) сохранялась компактная глобулярная структура получаемого отсоединенного RBS и (iii) сохранялись граничные контактные участки при интеграции донорского RBS в реципиентную молекулу.

Синтезировали двенадцать отдельных комбинаций донорских областей RBS из сконструированного HA с преимущественно сезонным иммунным профилем в сочетании с реципиентной стеблевой областью из пандемического штамма (табл. 3) и тестировали *in vitro* в отношении экспрессии на клеточной поверхности и надлежащей антигенной конформации с применением анализа на основе проточной цитометрии, как описано в международной заявке № PCT/US2015/033205, которая включена в данный документ посредством ссылки, и изображено на фиг. 2. Данный анализ обеспечивает надежный и быстрый скрининговый анализ для выявления структур, которые продуцируют функциональные антигены гемагглютиниона (HA) вируса гриппа для универсальных вакцин. Он предусматривает применение панели нейтрализующих антител для анализа экспрессии и конформации экспонированных на поверхности сконструированных антигенов HA. Он не только позволяет выявить и проверить сконструированные антигены HA, которые надлежащим образом экспрессируются и являются структурно правильными, но также позволяет прогнозировать широту и/или специфичность иммуногенности сконструированных антигенов HA. В панели антител можно применять антитела, которые известны как связывающиеся с конформационными эпитопами (например, эпитопами, близкими к сайту связывания с рецептором) головки HA и консервативными конформационными эпитопами (например, спиралью A) стеблевой области HA. В качестве неограничивающих примеров подходящие нейтрализующие антитела к головке могут включать: SH65 (современные сезонные штаммы до пандемического штамма 2009 г.) (Whittle, J.R.R. et al. PNAS 2011), 5J8 (современные сезонные и исторические штаммы) (Krause, J.C. et al. J. Virology 2011), 4K8 (только пандемические штаммы) (Krause, J.C. et al., J. Immunology 2011), AH4 и AH5. Подходящие нейтрализующие антитела к стеблевой области могут включать: C179 (HA группы 1) (Okuno, Y. et al., J. Virology 1993), AS2 (HA группы 1), AS3 (HA группы 1 и группы 2) и AS4 (HA группы 1).

Таблица 3

SEQ ID NO:	ID структуры	Донор RBS (сконструированный HA с преимущественно сезонным иммунным профилем)	Начало RBS	Конец RBS	Реципиент RBS (пандемический штамм)
SEQ ID NO: 7	DO2a_tr1	SMARt_DO2a	G63	G277	SMARt_DO1a*
SEQ ID NO: 8	DO2a_tr2	SMARt_DO2a	G63	G277	Cal2009
SEQ ID NO: 9	DO2a_tr3	SMARt_DO2a	G63	G277	SC1918
SEQ ID NO: 10	DO2a_tr4	SMARt_DO2a	G63	G277	NJ1976
SEQ ID NO: 11	DO2a_tr5	SMARt_DO2a	V125	G277	SMARt_DO1a*
SEQ ID NO: 12	DO2a_tr6	SMARt_DO2a	V125	G277	Cal2009
SEQ ID NO: 13	DO2a_tr7	SMARt_DO2a	V125	G277	SC1918
SEQ ID NO: 14	DO2a_tr8	SMARt_DO2a	V125	G277	NJ1976
SEQ ID NO: 15	DO2a_tr9*	SMARt_DO2a	P135	P269	SMARt_DO1a*

SEQ ID NO: 16	DO2a_tr10	SMARt_DO2a	P135	P269	Cal2009
SEQ ID NO: 17	DO2a_tr11	SMARt_DO2a	P135	P269	SC1918
SEQ ID NO: 18	DO2a_tr12	SMARt_DO2a	P135	P269	NJ1976

* Сконструированный НА с преимущественно пандемическим иммунным профилем.

Анализ состоял из трансфекции HEK293FT плазмидной ДНК с применением липофектамина. Через 24 ч после трансфекции перед окрашиванием поверхности клетки метили с помощью набора для окрашивания фиксируемых мертвых клеток в дальнем красном спектре LIVE/DEAD® для определения жизнеспособности клеток. Затем клетки, ресуспендированные в буфере для окрашивания (0,1% BSA в PBS), красили с помощью 0,4 микрограмма указанного немеченого нейтрализующего моноклонального антитела к гемагглютинину (например, CH65, 5J8, 4K8, AS3, C179, AS2 или AS4).

Окрашенные клетки промывали и ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания, содержащего 0,2 мкг вторичного антитела к IgG человека или мыши с Alexa Fluor® 488 (в зависимости от первичного антитела), и красили с помощью вторичного антитела в течение 20 мин при 4°C. Наконец окрашенные клетки ресуспендировали в растворе для фиксации (1,75% формальдегида в PBS) и хранили в течение ≤1 недели при 4°C.

Анализ на основе проточной цитометрии.

Фиксированные клетки промывали и ресуспендировали в 200 мкл PBS, а затем переносили в 96-луночный планшет с глубокими лунками для сбора образцов с применением пробоотборника High-Throughput от BD. Анализ образцов выполняли с применением проточного цитометра FACS Calibur от BD, оснащенного лазером с длиной волны, составляющей 488 нм (для возбуждения Alexa Fluor® 488) и лазером с длиной волны, составляющей 635 нм (для возбуждения красителя LIVE/DEAD дальнего красного спектра). Для определения оптимальных параметров сбора применяли образец ложно-трансфицированных клеток, окрашенных с помощью вторичного антитела с Alexa Fluor® 488, но без первичного антитела. В частности, для отображения популяции клеток HEK293FT на шкале и для исключения нежелательного дребеса регулировали коэффициент усиления прямого рассеяния (FSC), напряжение бокового рассеяния (SSC) и порог FSC. Для дополнительного исключения дребеса популяцию клеток гейтировали на графике FSC относительно SSC. Настройки детектора флуоресценции также регулировали с применением ложно-трансфицированных клеток, окрашенных только с помощью вторичного антитела. В частности, регулировали напряжение детектора FL1 (для детекции флуоресценции Alexa Fluor® 488) и детектора FL4 (для детекции флуоресценции красителя LIVE/DEAD дальнего красного спектра) для размещения флуоресцентного излучения гейтированной популяции клеток на уровне логарифма первого порядка. Для данной комбинации флуорофоров не требуются регулировки для компенсации, поскольку отсутствует спектральное наложение между Alexa Fluor® 488 и красителем LIVE/DEAD дальнего красного спектра. Все образцы получали с применением тех же параметров сбора данных, что и контрольный образец ложно-трансфицированных клеток. Для каждого образца подсчитывали по меньшей мере 10000 клеток в гейте FSC относительно SSC и данные сохраняли в виде файлов данных FCS.

Анализ данных выполняли с применением программного обеспечения FlowJo. Файл данных FCS, соответствующий ложно-трансфицированным клеткам, окрашенным с помощью только вторичного антитела, применяли для создания аналитических гейтов. В частности, гейт, включающий популяцию интактных клеток, сначала отображали на графике FSC относительно SSC. Данную субпопуляцию гейтированных клеток затем анализировали на отдельном графике, на котором отображена интенсивность флуоресценции FL4 (флуоресценции красителя LIVE/DEAD дальнего красного спектра) относительно FSC. Получали новый гейт, охватывающий популяцию клеток с низкой интенсивностью флуоресценции FL4. Данную новую субпопуляцию клеток, соответствующую интактным живым клеткам, дополнительно анализировали на отдельном графике, на котором отображена интенсивность флуоресценции FL1 (флуоресценции Alexa Fluor® 488) относительно FSC. Получали новый гейт, охватывающий клетки с положительной флуоресценцией FL1, определяемой значениями флуоресценции, которые обеспечивали выход, составляющий 95% ложно-трансфицированных клеток в отрицательной по FL1 фракции. Все файлы FCS анализировали с применением таких же аналитических гейтов. Значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) положительной по FL1 субпопуляции клеток для каждого образца клеток и результаты окрашивания экспортировали в файл Excel и применяли для расчета коэффициента связывания антител.

Значение MFI положительной по FL1 субпопуляции клеток для каждого образца клеток и результат окрашивания сначала корректировали путем вычитания фоновой флуоресценции, соответствующей тому же образцу клеток, окрашенному с помощью только вторичного антитела. Специфичность окрашивания с помощью каждого из нейтрализующих моноклональных антител к гемагглютинину подтверждали путем изучения значений скорректированной по фону MFI ложно-трансфицированных клеток (отрицательный контроль) и скорректированной по фону MFI клеток, трансфицированных с помощью плазмидной

ДНК НА дикого типа (положительный контроль). Если значение MFI для контролей попадает в ожидаемый диапазон значений, то коэффициент связывания антител для каждой плазмиды, кодирующей сконструированный НА, и нейтрализующего моноклонального антитела к НА определяли следующим образом:

$$\text{Коэффициент связывания антител (ABR)} = \frac{\text{MFI (НА х, первичное Ab у)} - \text{MFI (НА х, только вторичное Ab)}}{\text{MFI (НА дикого типа, первичное Ab у)} - \text{MFI (НА дикого типа, только вторичное Ab)}}$$

Каждый из рекомбинантных полипептидов НА экспрессировался на поверхности (т.е. он способен к межклеточному процессингу, сходному с антигенами гриппа дикого типа, продуцируемыми в инфицированной клетке) и сохранял укладку стеблевой области (сравнимо или лучше, чем контрольные штаммы дикого типа), что определяли по связыванию панели антител к стеблевой области в анализе на основе проточной цитометрии (фиг. 3). Данный эксперимент также демонстрирует, что в некоторых случаях модификации в области головки индуцировали умеренное увеличение связывания с mAb к стеблевой области. Таким образом, замены в одном месте могут оказывать дальнедействующие аллостерические эффекты на отдаленном местоположении. Аналогично, новые рекомбинантные полипептиды НА, полученные путем прививания областей RBS стеблевой области сезонных штаммов на стеблевой области пандемических штаммов, на удивление демонстрировали улучшенные сезонные иммунные профили. Данные переконструированные рекомбинантные полипептиды НА демонстрировали повышенное связывание нейтрализующих сезонный штамм антител относительно изначальной сконструированной родительской молекулой НА (SMARt_DO2a). (фиг. 4). В данных анализах "повышенное связывание mAb" представляет собой показатель средней интенсивности флуоресценции антитела, которое связывается с переконструированным НА, относительно контроля: немодифицированного родительского сконструированного НА (SMARt_DO2a) для CH65 и 5J8 и пандемического штамма дикого типа A/California/7/2009 H1N1 для 4K8. "Повышенное связывание mAb", следовательно, представляет собой примерный показатель аффинности антитела. В некоторых случаях сезонный иммунный профиль (измеренный по связыванию mAb) улучшался в 2-3 раза по сравнению с родительской сезонной сконструированной молекулой НА (фиг. 5; сравнение результатов связывания антитела к сезонной головке (например, CH65 и 5J8) из столбца 2 с переконструированными конструкциями в столбцах 5 и 6).

Поскольку часть RBS у привитых антигенов является идентичной части RBS у сконструированного НА с преимущественно сезонным иммунным профилем, увеличение широты относительно реципиентного пандемического штамма происходит благодаря отличной от RBS части переконструированного НА. Увеличение широты лучше видно в экспериментах *in vivo*, чем в анализах HAI или анализах связывания с антителами, которые нацелены на RBS.

Пример 2. Разрушение сайтов N-гликозилирования и/или вставка в петлю увеличивает спектр иммунологической активности сконструированного полипептида НА.

В данном примере описана вторая стратегия увеличения спектра иммунологической активности сконструированных полипептидов НА путем модификации остатков, связанных с прогнозируемыми сайтами N-гликозилирования и введения лизина в петлю, ограничивающую RBS. Сезонные штаммы гриппа содержат дополнительные предполагаемые сайты N-гликозилирования по сравнению с пандемическими штаммами. Гликозилирование обладает способностью блокировать антигенные сайты в НА, изменяя иммунный ответ. Такие сайты гликозилирования выявляли по мотиву последовательности NxS/Ty, где x и y не представляют собой пролин (P). Аспарагин в данном паттерне N-гликозилирования можно обнаружить в полипептидах НА вблизи или непосредственно по остаткам, соответствующим 142 и 177 (согласно нумерации CA09) в сайте связывания с рецептором (фиг. 6; в левой части показаны соответствующие последовательности в пандемическом штамме H1N1 дикого типа и соответствующие гликозилированные последовательности в иллюстративном сконструированном полипептиде НА, "DO2").

Вставка лизина в петлю в пределах или вблизи прогнозируемых сайтов N-гликозилирования области RBS НА представляет собой признак вирусов пандемического гриппа А. Вставка в петлю (например, вставка остатка лизина или аргинина) вблизи сайтов N-гликозилирования обеспечивает признак пандемического штамма в сконструированном полипептиде НА (фиг. 6; центральная часть).

Модификация остатков вокруг сайта RBS рядом с эпитопом CH65, дополнительно включает признаки вирусов пандемического гриппа А (фиг. 6; правая часть).

Для демонстрации увеличенного спектра иммунологической активности, придаваемого сконструированному полипептиду НА посредством модификаций прогнозируемого сайта N-гликозилирования и/или вставки лизина в петлю, конкретные аминокислотные остатки в иллюстративном сконструированном полипептиде НА ("SMARt_DO2a") модифицировали таким образом, чтобы они отражали наблюдаемые в полипептидах НА, подобных пандемическим. В табл. 4 продемонстрированы потенциальные аминокислотные замены, которые можно сделать в данных сайтах и которые определяли по наблюдаемым остаткам в каждом положении у циркулирующих вирусов гриппа А.

Таблица 4

Сайт N-гликозилирования (согласно нумерации CA09)	Индекс остатка сконструированного HA	Иллюстративные остатки	Замены AA для разрушения паттерна NxS/T
142	142	N	D, K, S
	143	H	Y
	144	T	E, D, N
	145	V	I, L, P, S, T
	146	T	D, L, N, S
	147 (вставка в петлю)	- (гэп)	K, R
177	177	N	K, R, T
	178	L	I
	179	S	I, K, N, R

Для демонстрации действия разрушения сайтов N-гликозилирования на спектр иммунологической активности полипептидов HA получали сконструированные молекулы HA с разрушением двух мотивов сайтов N-гликозилирования. Кроме того, получали два сконструированных полипептида HA, у которых были разрушены мотивы сайтов N-гликозилирования и вставляли лизин в петлю, ограничивающую RBS (табл. 5).

Разрушение только мотива гликозилирования, также как в комбинации со вставкой лизина в петлю обеспечивало продуцирование рекомбинантных полипептидов HA, которые экспрессируются на поверхности и сохраняют укладку стеблевой области, что определяли посредством анализа на основе проточной цитометрии (фиг. 7). Как и в предыдущем случае наблюдали, что модификации в области головки индуцировали умеренное увеличение связывания с mAb к стеблевой области, что свидетельствует, что замены в одном месте могут оказывать дальнедействующие аллостерические эффекты на отдаленном местоположении. Данные модификации также содействуют достижению увеличенного спектра иммунологической активности на основе распознавания панелью антител (фиг. 8). Более конкретно, несколько из переконструированных антигенов демонстрируют как улучшенные сезонные свойства (повышенное связывание mAb у антител CH65 и 5J8 к сезонной головке), так и увеличенный спектр иммунологической активности, что демонстрируется 50-150% увеличением связывания антитела 4K8 к пандемической головке (см. конструкции DO2a_m1-m3 на фиг. 8).

Таблица 5

Конструкция	Индексы остатков (согласно нумерации CA09)	Исходная последовательность (сконструированный HA, например, DO2a)	Модифицированные последовательности
1	144, 145, 146	TVT	<u>DSN</u>
	177	N	<u>K</u>
2	144, 145, 146	TVT	<u>DSN</u>
	177	N	<u>K</u>
	147	- (гэп)	<u>K</u>
3	144, 145, 146	TVT	<u>ETT</u>
	177	N	<u>K</u>
	147	- (гэп)	<u>K</u>

Пример 3. Модификации аминокислотных остатков в области RBS и N-гликозилирования увеличивают спектр иммунологической активности сконструированного полипептида HA.

В данном примере описаны модификации сконструированного полипептида HA в области или рядом с RBS в HA путем введения аминокислотных замен. Аминокислотные замены являются специфичными по положениям и получены из остатков, выявленных в результате анализа области головки HA у циркулирующих вирусов гриппа А. В табл. 6 описан пул остатков в конкретных положениях, охватывающих остатки 60-291 (на основе нумерации CA/09), из которых были выбраны конкретные аминокислотные замены для целевой модификации глобулярной головки HA. В табл. 7 описан меньший пул остатков в конкретных положениях, охватывающих остатки 137-262 (на основе нумерации CA/09), из которых были выбраны конкретные аминокислотные замены для целевой модификации глобулярной головки HA. В табл. 8 описан пул остатков, применяемый для целевой модификации иммунологического профиля

НА для остатков в пределах 10 ангстрем от RBS. Данные остатки обозначены штриховкой на фиг. 9.

Таблица 6

Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА
60	K, L, N, Q, S, R	105	G, W	145	A, I, L, P, S, T, V	182	F, Y	217	F, L, S	253	Q, P, S
61	I, L	106	A, I, M, T	146	D, L, N, S, T	183	A, E, F, I, K, L, S, T, V	218	I, V	254	E, G, R
62	G, K, M, N, R	111	E, D, G, H, N, V, Y	147	I, K, N, R, -	185	D, K, N, S	219	E, G, M, S, W, V	255	E, D, G, N
63	E, G	113	A, I, N, S, T, V	149	A, E, I, T, V	186	K, Q, R	220	S, T	256	K, R, T
64	A, E, I, K, M, T, V	114	D, N	150	S, T	187	E, D, G, K, R	221	P, S, T	257	I, V
65	A, I, P, S, T, V	116	E, G, V	151	A, I, M, S, T, V	188	E, K, N, R	222	H, K, N, R, T	258	I, M, T
68	H, N, Q	119	K, R, T	152	A, S	189	E, D, G, K, V	224	N, S, Y	259	F, L
70	D, G	120	E, K	154	A, H, L, P, S, T	190	I, V	225	G, K, Q, R	261	A, T
71	E, K, N, S, R	121	H, L, Q, R	155	H, N, Q, S, R, Y	192	I, M, L, V	226	E, I, K, M, N, R	262	N, S, T
73	D, N, S, T	123	G, N, S	156	A, E, D, G, K, N, S,	193	I, L	227	F, L, S	266	A, I, M, L, V

					R, T, V						
74	I, V	124	S, T	157	E, G, K, R	195	A, G	228	E, I, K, N, R, T	267	A, I, V
77	R, W	125	A, I, M, L, V	158	A, E, K, M, S, T, V	196	I, V	231	I, V	269	I, K, M, S, R, W
78	I, L, V	126	L, S, T	159	K, L, N, S, R	198	H, N	232	A, E, G, T, V	270	F, H, Y
83	E, D, G, K	127	L, S	160	G, N, S	199	Q, P, S	233	A, E, I, K, M, R, T, V	273	A, E, T, V
85	E, D, G	128	F, L	163	E, K, N, Q, R	200	A, P, S	234	R	274	I, M, L, V
86	F, L, P, S, T	129	E, K	164	N, S	201	A, D, N, S, T	235	L, P	275	E, D, G, K, N, S, R, V
87	F, I, L, P	130	K, R	166	I, M, L, V	202	A, D, I, M, N, P, S, T, Y	236	K, R	276	G, K, R
88	F, I, L, P, S, T, V, Y	131	F, Y	168	I, L	203	A, E, D, G, I, K, N, S, R, T, V	237	I, M, V	277	D, G, K, N, S, T
89	A, I, K, P, S, T	132	E, K	169	A, I, T, V	204	A, B, E, D, G, N, V, Y	238	K, R	278	A, D, F, L, P, S, T, V, Y
90	A, E, I, K, N, S,	133	I, M, L, V	170	E, G, K, Q,	205	Q, R	239	E, D, G, K, N	279	E, D, G, N, S, R

	R, T, V				R, V						
91	E, D, G, I, K, N, S, R	134	F, V	171	A, E, K, N, R, T	206	K, M, L, N, Q, S, R	240	Q, R	280	A, F, P, S, Y
92	S, T	135	H, P, S	172	E, D, G, K, N	207	A, G, I, N, S, R, T	241	A, E, G, H, K, P, S, T	281	D, G, S
94	P, S	136	E, K, M, N, Q, R	173	D, G, I, K, N, S, T	208	I, J, L	242	A, G, R	282	F, I, V
97	A, I, V	137	A, E, D, G, I, S, T, V	174	L, S, T	210	H, K, N, Q, S, R	244	I, M	283	F, I, M, V
99	A, I, K, N, S, R, T	138	G, I, N, S, R, T	176	P, S	211	K, N, S, T	245	D, K, N, S	284	I, K, M, L, N, S, R, T, V
100	F, P, S, T, Y	139	A, S	177	E, K, M, N, S, R, T	212	A, E, D, G, I, N, T, V	247	H, Y	285	S, T
101	D, G, I, K, N, S, T, Y	141	L, P, S	178	F, I, L, V	213	E, D, H, N, Y	249	A, I, T	286	E, D, G, N
102	A, P, S, T	142	D, K, N, S, Y	179	G, I, K, N, S, R, T	214	A, S, T	250	I, M, L, V	287	A, I, K, S, T, V
103	E, D, G, K, N, R, Y	143	H, Y	180	E, I, K, M, N, Q, S, R, T	215	H, Y	251	I, L, V	288	H, L, Q, P, S, T
104	D, K, N	144	E, D, N, S, T	181	F, P, S, T	216	A, I, V	252	A, E, D, G, K, N, V	289	A, F, I, M, L, V
										290	D, G, H, N, Q, R, Y
										291	E, D, G, K, N

Таблица 7

Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированной молекулы	Замены АА
137	A, E, D, G, I, S, T, V	171	A, E, K, N, R, T	203	A, E, D, G, I, K, N, S, R, T, V	234	R
138	G, I, N, S, R, T	172	E, D, G, K, N	204	A, B, E, D, G, N, V, Y	235	L, P
139	A, S	173	D, G, I, K, N, S, T	205	Q, R	236	K, R
141	L, P, S	174	L, S, T	206	K, M, L, N, Q, S, R	237	I, M, V
142	D, K, N, S, Y	176	P, S	207	A, G, I, N, S, R, T	238	K, R
143	H, Y	177	E, K, M, N, S, R, T	208	I, J, L	239	E, D, G, K, N
144	E, D, N, S, T	178	F, I, L, V	210	H, K, N, Q, S, R	240	Q, R
145	A, I, L, P, S, T, V	179	G, I, K, N, S, R, T	211	K, N, S, T	241	A, E, G, H, K, P, S, T
146	D, L, N, S, T	180	E, I, K, M, N, Q, S, R, T	212	A, E, D, G, I, N, T, V	242	A, G, R
147	I, K, N, R, -	181	F, P, S, T	213	E, D, H, N, Y	244	I, M
149	A, E, I, T, V	182	F, Y	214	A, S, T	245	D, K, N, S
150	S, T	183	A, E, F, I, K, L, S, T, V	215	H, Y	247	H, Y
151	A, I, M, S, T, V	185	D, K, N, S	216	A, I, V	249	A, I, T
152	A, S	186	K, Q, R	217	F, L, S	250	I, M, L, V
154	A, H, L, P, S, T	187	E, D, G, K, R	218	I, V	251	I, L, V
155	H, N, Q, S, R, Y	188	E, K, N, R	219	E, G, M, S, W, V	252	A, E, D, G, K, N, V
156	A, E, D, G, K, N, S, R, T, V	189	E, D, G, K, V	220	S, T	253	Q, P, S
157	E, G, K, R	190	I, V	221	P, S, T	254	E, G, R
158	A, E, K, M, S, T, V	192	I, M, L, V	222	H, K, N, R, T	255	E, D, G, N
159	K, L, N, S, R	193	I, L	224	N, S, Y	256	K, R, T
160	G, N, S	195	A, G	225	G, K, Q, R	257	I, V
163	E, K, N, Q, R	196	I, V	226	E, I, K, M, N, R	258	I, M, T

164	N, S	198	H, N	227	F, L, S	259	F, L
166	I, M, L, V	199	Q, P, S	228	E, I, K, N, R, T	261	A, T
168	I, L	200	A, P, S	231	I, V	262	N, S, T
169	A, I, T, V	201	A, D, N, S, T	232	A, E, G, T, V		
170	E, G, K, Q, R, V	202	A, D, I, M, N, P, S, T, Y	233	A, E, I, K, M, R, T, V		

Таблица 8

Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА	Индекс остатка сконструированного НА	Замены АА
90	A, E, I, K, N, S, R, T, V	138	G, I, N, S, R, T	157	E, G, K, R	195	A, G
91	E, D, G, I, K, N, S, R	139	A, S	158	A, E, K, M, S, T, V	210	H, K, N, Q, S, R
92	S, T	141	L, P, S	159	K, L, N, S, R	211	K, N, S, T
125	A, I, M, L, V	142	D, K, N, S, Y	177	E, K, M, N, S, R, T	212	A, E, D, G, I, N, T, V
126	L, S, T	143	H, Y	178	F, I, L, V	213	E, D, H, N, Y
127	L, S	144	E, D, N, S, T	179	G, I, K, N, S, R, T	214	A, S, T
128	F, L	145	A, I, L, P, S, T, V	180	E, I, K, M, N, Q, S, R, T	215	H, Y
129	E, K	146	D, L, N, S, T	181	F, P, S, T	216	A, I, V
130	K, R	147	I, K, N, R, -	182	F, Y	217	F, L, S
131	F, Y	149	A, E, I, T, V	183	A, E, F, I, K, L, S, T, V	218	I, V
132	E, K	150	S, T	185	D, K, N, S	219	E, G, M, S, W, V
133	I, M, L, V	151	A, I, M, S, T, V	186	K, Q, R	220	S, T
134	F, V	152	A, S	187	E, D, G, K, R	221	P, S, T
135	H, P, S	154	A, H, L, P, S, T	188	E, K, N, R	222	H, K, N, R, T
136	E, K, M, N, Q, R	155	H, N, Q, S, R, Y	189	E, D, G, K, V	224	N, S, Y
137	A, E, D, G, I, S, T, V	156	A, E, D, G, K, N, S, R, T, V	190	I, V	225	G, K, Q, R
				192	I, M, L, V	226	E, I, K, M, N, R
				193	I, L	245	D, K, N, S
						247	H, Y
						249	A, I, T

В табл. 9 описаны модификации остатков в сконструированном полипептиде НА с сезонным иммунным профилем, которые тестировали в качестве доказательства принципа. Данные модификации включают комбинирование модификаций области RBS с описанными выше модификациями профиля гликозилирования (например, разрушением сайтов гликозилирования). Данные модификации приводят к получению рекомбинантного полипептида НА, который характеризуется надлежащей укладкой и экс-

прессируется на поверхности (фиг. 7). Как и в предыдущем случае наблюдали, что модификации в области головки индуцировали умеренное увеличение связывания с mAb к стеблевой области, что свидетельствует, что замены в одном месте могут оказывать дальнедействующие аллостерические эффекты на отдаленном местоположении. Переконструированные рекомбинантные HA распознавались антителами, специфическими в отношении как пандемических, так и сезонных штаммов (фиг. 8). Интересно, что отдельно модификации RBS улучшали сезонный иммунный профиль (фиг. 8, DO2a_m4-m5; "модифицированное CH65"), но оказывали незначительное влияние на пандемический профиль. Однако, комбинирование модификаций области RBS с модификациями гликозилирования значительно улучшало как сезонный, так и пандемический иммунные профили. (фиг. 8, DO2a_m7-m9; "Агликозил+mCH65"). Эти данные свидетельствуют о том, что модификации улучшают сезонный иммунный профиль ("увеличенное связывание mAb") и делают иммунный профиль более пандемическим ("увеличенный спектр"), за счет чего обеспечивается получение общего более сбалансированного иммунного профиля, способного справляться со сложностями, вызванными антигенным дрейфом и антигенным сдвигом, у иллюстративного сконструированного полипептида HA (например, SMART_DO2a).

Таблица 9

Конструкция	Модификация	Индексы остатков (согласно нумерации CA09)	Исходная последовательность сконструированного HA (SMART_DO2a)	Модифицированные последовательности
1	E137T (изменение заряда)	137	E	T
	антигенный сайт Ca	154-159	SHNGKS	PHAGAK
	антигенный сайт Sa	210-214	HTEN	QNAD
	N262T	262	N	T
2	антигенный сайт Ca	154-159	SHNGKS	PHAGAK
	антигенный сайт Sa	210-214	HTEN	QNAD
3	антигенный сайт Sa	210-214	HTEN	QNAD
4	E137T (изменение заряда)	137	E	T
	Ngly142	144-145	TV	NT
	антигенный сайт Ca	154-159	SHNGKS	PHAGAK
	Ngly177	177	N	T
	антигенный сайт Sa	210-214	HTEN	QNAD
5	N262T	262	N	T
	Ngly142	144-145	TV	NT
	антигенный сайт Ca	154-159	SHNGKS	PHAGAK
	Ngly177	177	N	T
6				
	Ngly142	144-145	TV	NT
	Ngly177	177	N	T
	антигенный сайт Sa	210-214	HTEN	QNAD

Пример 4. Эффективность *in vivo* сконструированных полипептидов HA.

В данном примере проиллюстрировано, что сконструированные полипептиды HA, модифицированные в соответствии с описанными в данном документе способами, обеспечивали иммунные ответы в виде широких ответов с выработкой антител к нескольким штаммам гриппа.

Получение вирусоподобных частиц на основе вируса гриппа (VLP), содержащих сконструированные мозаичные гемагглютинины (HA) VLP на основе вируса гриппа получали путем временной трансфекции тремя плазмидами клеток НЕК293Т в бессывороточной среде Freestyle293. Плазмиды, кодирующие последовательность сконструированного полипептида HA, а также последовательности NA и gag HIV, смешивали в соотношении 1:1:1 и применяли для временной трансфекции клеток НЕК293Т. Через 120 ч после трансфекции собирали культуральные надосадочные жидкости и осаждали VLP в надосадочной жидкости посредством ультрацентрифугирования на подушке 20% сахарозы и ресуспендировали в PBS.

Иммунизация мышей с помощью VLP, экспрессирующих сконструированные HA.

Для оценки иммуногенности структур сконструированных мозаичных HA иммунизировали группы самок мышей BALB/c возрастом 6-8 недель с помощью 5 мкг VLP на основе вируса гриппа или только среды-носителя (PBS). Все препараты для иммунизации составляли в виде эмульсий по типу "масло в воде" с адьювантом и доставляли подкожно в общем объеме, составляющем 100 мкл. Каждая группа получала идентичную ревакцинирующую дозу через 21 день после начальной иммунизации. Сыворотку до и после иммунизации собирали от каждого животного соответственно в дни 0 и 35. Пулы сыворотки, применяемые для анализа, получали путем смешивания равных объемов сыворотки от каждого животного в группе.

Анализ ингибирования гемагглютинации (HAI).

Серийные разведения в нескольких повторностях объединенной в пул сыворотки из каждой группы смешивали с 4 гемагглютинирующими единицами указанного вируса и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в круглодонном планшете. Затем каждую смесь сыворотка/вирус смешивали с равным объемом 0,5% суспензии эритроцитов индейки в солевом растворе. Планшеты оценивали, когда в контрольных лунках без сыворотки наблюдалась полная гемагглютинация (~30 мин). HAI-титр определяли как максимальное разведение сыворотки, приводящее к полному ингибированию гемагглютинации в 50% тестовых лунок.

Анализ микронеutralизации (MN).

Серийные разведения в нескольких повторностях объединенной в пул сыворотки из каждой группы смешивали со 100 дозами инфицирования 50% культуры ткани (TCID₅₀) вируса и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем каждую смесь сыворотка/вирус добавляли к слившимся монослоям клеток Мадин-Дарби почек собак (MDCK) и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Затем монослои фиксировали и выявляли инфицированные лунки на основе ELISA-детекции нуклеопротеина гриппа. Титр MN определяли как наибольшее разведение сыворотки, приводящее к полной нейтрализации вирусной инфекции в 50% тестовых лунок.

Анализы иммуногенности.

Анализы HAI проводили с применением модифицированных рекомбинантных полипептидов HA с областями RBS, привитыми на реципиентные стеблевые области, модификаций для удаления или конструирования предполагаемых сайтов N-гликозилирования и/или целевых модификаций остатков в области RBS. Данные модифицированные рекомбинантные полипептиды HA обеспечивают более широкий иммунный ответ.

Пример 5. Иллюстративные модифицированные рекомбинантные полипептиды HA.

В данном примере проиллюстрированы примеры модифицированных рекомбинантных полипептидов HA, полученных с применением различных описанных в данном документе способов.

DO2aRBStrunc00_resG63_G278_graftedontDo1a (SEQ ID NO: 7)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNG
 KLCKLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCPYGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
 YANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
 GRINYYWTLLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSDTPVHDCNTTCQTPQGAIN
 SSLPFQNVHPVTIGECKPYVRSAKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAFGIEGGWTGMVDGW
 YGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNKLERRMENL
 NKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEF

YHKCNNTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLL
VSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc00_resG63_G277_graftedontoCal2009 (SEQ ID NO: 8)

MKAKLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHN
GKLCKLRGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSK
SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
EGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAI
NTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWY
GYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNK
KVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYH
KCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLG
AISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc00_resG63_G277_graftedontoSC1918 (SEQ ID NO: 9)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNG
KLCKLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
YANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGSGSGIITSDAPVHDCNTKQTPHGAIN
SSLPFQNIHPVTIGECPKYVVRSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWY
GYHHQNEQSGYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNLERRIENLNK
KVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVRNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYH
KCDDACMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSL
GAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc00_resG63_G277_graftedontoNJ1976 (SEQ ID NO: 10)

MKAKLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED RHN
GKLCKLGGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSK
SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
EGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGSGSGIISDAPVHDCNTKQTPKGAI
NTSLPFQNIHPVTIGECPKYVKSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW
YGYHHQNEQSGYAADQRSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLN
KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVRSQLRNNAKEIGNGCFEFY

HKCDDTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLLVSL
GAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc01_resV125_G277_graftedontoDo1a (SEQ ID NO: 11)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNG
KLCKLKGIAPLQLGKCSVAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSPDNGTCYPGYFADYEEL
REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
YANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSDTPVHDCNTTCQTPQGAIN
SSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMATGLRNIPSISRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGW
YGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENL
NKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEF
YHKCNNTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLL
VSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc01_resV125_G277_graftedontoCal2009 (SEQ ID NO: 12)

MKAKLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHN
GKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSK
SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
EGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGAGSGIISDTPVHDCNTTCQTPKGAI
NTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSISRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWY
GYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNK
KVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYH
KCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLG
AISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc01_resV125_G277_graftedontoSC1918 (SEQ ID NO: 13)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNG
KLCKLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDLLLTASSWSYIVETSNSENGTCYPGDFIDYEE
REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
YANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGSGSGIITSDAPVHDCNTKCQTPHGAIN
SSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSTKL RMATGLRNIPSISRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWY
GYHHQNEQGSYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNLERRIENLNK
KVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDFHDSNVRNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYH

KCDDACMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSL
GAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc01_resV125_G277_graftedontoNJ1976 (SEQ ID NO: 14)

MKAKLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDRHN
GKLCKLGGIAPHLGKCNIAGWLLGNPECELLLVSSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYE
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSK
SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
EGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGSGSGIIISDAPVHDCNTKCQTPKGAI
NTSLPFQNIHPVTIGCEPKYVKSTKLRLMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGW
YGYHHQNEQSGYAADQRSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLN
KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVRSQLRNNAKEIGNGCFEY
HKCDDTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLLVSL
GAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc02_resP135_P269_graftedontoDoIa (SEQ ID NO: 15)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDSHNG
KLCKLKGIAPLQLGKCSVAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSPDNGTCYPGYFADYEEL
REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
YANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSDTPVHDCNTTCQTPQGAIN
SSLPFQNVHPVTIGCEPKYVRSAKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGW
YGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENL
NKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNNAKEIGNGCFEF
YHKCNNTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLL
VSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc02_resP135_P269_graftedontoCal2009 (SEQ ID NO: 16)

MKAKLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHN
GKLCKLRGVAPHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSK
SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
EGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAI
NTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWY
GYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNK
KVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNAKEIGNGCFEYH

KCDNTCMESVKNQTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLG
AISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc02_resP135_P269_graftedontoSc1918 (SEQ ID NO: 17)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNG
KLCKLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDLLTASSWSYIVETSNSENGTCYPGDFIDYEEL
REQLSSVSSFEEKFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS
YANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE
GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALNRGSGSGIITSAPVHDCNTKQCQTPHGAI
NSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW
YGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNLERRIENLN
KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVRNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEY
HKCDDACMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVS
LGAISFWMCSNGSLQCRICI

DO2aRBStrunc02_resP135_P269_graftedontoNj1976 (SEQ ID NO: 18)

MKAKLLVLLCTFTATYADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDRH
GKLCGLGGIAPLHLGKCNIAWLLGNPECELLTVSSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEEL
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSK
SYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
EGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFAMNRGSGSGIISDAPVHDCNTKQCQTPKGAI
NTSLPFQNIHPVTIGECPKYVKSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW
YGYHHQNEQSGYAADQRSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLN
KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVRSQLRNNAKEIGNGCFEY
HKCDDTCMESVKNQTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLLVSL
GAISFWMCSNGSLQCRICI

SMARt_NC_DO2a_NGlyMod (SEQ ID NO: 19)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILEDSHNG
KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCPYGYFADYEEL
REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHDSN-GVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPKLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
KVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALS RGFSGIITSNAPMDKCDAC
QTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWT
GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKL
ERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEI

GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTV
 ASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMART_NC_DO2a_NGlyMod+loopInsertion(CA09) (SEQ ID NO: 20)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILEDSHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHDSNKGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPKLSK
 SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
 EGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDAKCQTPQGA
 INSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDG
 WYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERMEN
 LNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFE
 FYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLL
 VSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMART_NC_DO2A_NGLYMOD+LOOPINSERTION(SC18) (SEQ ID NO: 21)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILEDSHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHETTKGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPKLSK
 SYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQ
 EGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDAKCQTPQGA
 INSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDG
 WYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERMEN
 LNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFE
 FYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLL
 VSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMART_NC_DO2a_mods_outside_ch65_eptiope1 (SEQ ID NO: 22)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILEDSHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHTVT-GVSASCPHAGAKSFYRNLLWLTGKNGLYPNLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYQNADAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
 KVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEATGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDAKCQ
 TPQGA INSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWTG
 MVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLER
 RMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIG

NGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVA
 SSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMART_NC_DO2a_mods_outside_ch65_eptiope2 (SEQ ID NO: 23)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILED SHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVT-GVSASCPHAGAKSFYRNLLWLTGKNGLYPNLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
 KVRDQEGRINYWTLLPEGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDAC
 QTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWT
 GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKL
 ERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEI
 GNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTV
 ASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMART_NC_DO2a_mods_outside_ch65_eptiope3 (SEQ ID NO: 24)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILED SHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVT-GVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYQNADAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
 KVRDQEGRINYWTLLPEGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDAC
 QTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWT
 GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKL
 ERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEI
 GNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTV
 ASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMART_NC_DO2a_mods_outside_ch65_eptiope1-noGly (SEQ ID NO: 25)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILED SHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHNTT-GVSASCPHAGAKSFYRNLLWLTGKNGLYPKLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYQNADAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
 KVRDQEGRINYWTLLPEGDTIIFEATGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDACQ
 TPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWTG
 MVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLER

RMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIG
 NGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVA
 SSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMARt_NC_DO2a_mods_outside_ch65_eptiope2-noGly (SEQ ID NO: 26)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILEDSHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTT-GVSASCPHAGAKSFYRNLLWLTGKNGLYPKLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
 KVRDQEGRINYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDACK
 QTPQGAINSSLFPQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWT
 GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKL
 ERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEI
 GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTV
 ASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SMARt_NC_DO2a_mods_outside_ch65_eptiope3-noGly (SEQ ID NO: 27)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNILEDSHNG
 KLCLLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCPGYFADYEEL
 REQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTT-GVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPKLS

KSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQRALYQNADAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRP
 KVRDQEGRINYWTLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDKCDACK
 QTPQGAINSSLFPQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMTGLRNIPFIQSRGLFGAIAGFIEGGWT
 GMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKL
 ERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEI
 GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTV
 ASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

Изобретение также охватывает модифицированные рекомбинантные полипептиды HA, которые имеют аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной любой из описанных в данном документе последовательностей.

Пример 6. Модификации рекомбинантных полипептидов HA для увеличения пандемических признаков.

Отбирали дополнительные структуры для тестирования влияния дегликозилирования BO2a/модификации RBS на спектр ответов с выработкой Ab и защиту от заражения пандемическим A/California/09. Переконструирование RBS SMARtDO2a улучшает распознавание антителами с широким спектром нейтрализации, что продемонстрировано приростом связывания 4K8 с дегликозилированными конструкциями в анализе MFI (фиг. 10). По результатам оценок *in vivo* исходная структура SMARt DO2a оказывает влияние в отношении сезонных штаммов; структуру модифицировали с целью увеличения спектра в отношении пандемических штаммов. Анализы *in vitro* с применением панели mAb свидетельствовали о связывании пандемических mAb с некоторыми модифицированными структурами. Оценивали подгруппу структур в мышинной модели контрольного заражения в отношении A/California/07/2009. Результаты демонстрируют, что модификации действительно улучшают иммунный профиль против пандемического гриппа А.

Иммунизация мышей с помощью VLP, экспрессирующих переконструированные HA.

Для оценки иммуногенности структур переконструированных мозаичных HA иммунизировали группы самок мышей BALB/c возрастом 6-8 недель с помощью 3 мкг VLP на основе вируса гриппа или только среды-носителя (PBS). Все препараты для иммунизации составляли в виде эмульсий по типу "масло в воде" с адьювантом и доставляли внутримышечно в общем объеме, составляющем 100 мкл, как показано в табл. 10. Каждая группа получала две идентичные ревакцинирующие дозы через 21 день и 42 дня после начальной иммунизации. Сыворотку до иммунизации собирали от каждого животного в день 0. Сыворотку после иммунизации собирали от каждого животного в дни 42, 56 и 69. На фиг. 11 продемонстрировано расписание иммунизаций и последующей оценки *in vivo*. Пулы сыворотки, применяемые для анализа, получали путем смешивания равных объемов сыворотки от каждого животного в группе.

Таблица 10

Группа	n ¹	Антиген (день 0)	Антиген (день 21)	Антиген (день 42)	Доза (мг)	Адьювант	Инъекционный путь	Заражение (день 70)
1	24	PBS	PBS	PBS	NA	AF03	IM	A/Cal/2009
2	24	VLP- SMARtDO2 a	VLP- SMARtD O2a	VLP- SMARtDO2 a	3	AF03	IM	A/Cal/2009
3	24	VLP- SMARtDO2 a m1	VLP- SMARtD O2a m1	VLP- SMARtDO2 a m1	3	AF03	IM	A/Cal/2009
4	24	VLP- SMARtDO2 a m2	VLP- SMARtD O2a m2	VLP- SMARtDO2 a m2	3	AF03	IM	A/Cal/2009
5	24	VLP- SMARtDO2 a m8	VLP- SMARtD O2a m8	VLP- SMARtDO2 a m8	3	AF03	IM	A/Cal/2009
6	24	Cal09 IV (SWFT)	Cal09 IV (SWFT)	Cal09 IV (SWFT)	1,5	AF03	IM	A/Cal/2009

Выживаемость и вес тела мышей, иммунизированных с помощью VLP, экспрессирующих переконструированные HA

Животных подвергали контрольному заражению с помощью десятикратной LD₅₀ пандемического A/California/2009 в день 70 и отслеживали смертность после контрольного заражения. Иммунизация с помощью исходного SMARtDO2a защищает от контрольного заражения A/California/09, при этом 80% животных выживали через 14 дней после контрольного заражения по сравнению с животными, иммунизированными только с помощью среды-носителя, что приводило к 100% смертности ко дню 6 после контрольного заражения. Модификации DO2a следующего поколения улучшают выживаемость по сравнению с исходным SMARtDO2a, при этом иммунизация с помощью SMARtDO2a_m8 является эффективной в защите 100% тестовых животных (фиг. 12).

Отслеживали процент потери массы тела животных после контрольного заражения вирусом. Модификации DO2a следующего поколения улучшают сохранение массы тела в сравнении с исходным SMARtDO2a. SMARtDO2a_m8 обеспечивает наилучшую защиту от потери веса, индуцированной контрольным заражением вирусом (фиг. 13).

Титры вируса в легких мышей, иммунизированных с помощью VLP, экспрессирующих переконструированные HA.

Дополнительно отслеживали титры вируса в легких мышей в день 4 после контрольного заражения. Иммунизация с помощью конструкций SMARtDO2a приводит к более низким титрам вируса в легких по сравнению с PBS. Конструкция SMARtDO2a_m8 приводит к 10-кратному уменьшению титров в легких по сравнению с PBS и значительно более низким титрам вируса в легких, чем все другие конструкции DO2a (фиг. 14).

Анализ ингибирования гемагглютинации (HAI).

Серийные разведения в нескольких повторностях объединенной в пул сыворотки из каждой группы смешивали с 4 гемагглютинирующими единицами указанного вируса и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в круглодонном планшете. Затем каждую смесь сыворотка/вирус смешивали с равным объемом 0,5% суспензии эритроцитов индейки в солевом растворе. Планшеты оценивали, когда в контрольных лунках без сыворотки наблюдалась полная гемагглютинация (~30 мин). HAI-титр определяли как максимальное разведение сыворотки, приводящее к полному ингибированию гемагглютинации в 50% тестовых лунок. HAI-ответы A/California/09 у мышей с SMARtDO2a_m8 значительно отличаются от HAI-ответов у мышей с PBS (P<0,001), однако, только у 6/24 мышей был HAI-титр, равный или превышающий 1:40 (фиг. 15). Механизм защиты всех других конструкций DO2a остается неясным.

Все модифицированные конструкции DO2a следующего поколения способны частично защищать от смертности при контрольном заражении A/California/09. SMARtDO2a_m8 демонстрирует наилучшее уменьшение смертности, потери веса и титра вируса в легких. SMARtDO2a_m8 также представляет собой единственную конструкцию DO2a, обеспечивающую HAI-ответы на штамм A/Cal/09, что позволяет предположить, что улучшенная защита возможно связана с ответами на головку молекулы. Как продемонстрировано в данном документе, модификации DO2a следующего поколения являются успешными в увеличении защиты от контрольного заражения пандемическим гриппом А.

Эквиваленты.

Использование порядковых терминов, таких как "первый", "второй", "третий" и т.д., в формуле изобретения для модификации элемента пункта формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, предпочтения или порядка одного элемента пункта формулы относительно другого или временный порядок, в котором выполняют действия способа, но их используют лишь в качестве меток, чтобы отличить один элемент пункта формулы изобретения, имеющий определенное название, от другого

элемента, имеющего такое же название (но в случае использования порядкового термина), чтобы различать элементы пункта формулы изобретения.

Как используется в данном документе, формы единственного числа в описании и в формуле изобретения, если четко не указано обратное, следует понимать как включающие ссылки на множественное число. Пункты формулы изобретения или описания, которые включают "или" между одним или более представителями группы, считаются удовлетворительными, если один, больше одного или все представители группы присутствуют, применяется или иным образом относятся к указанному продукту или способу, если не указано обратное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых ровно один представитель группы присутствует, применяется или иным образом относится к указанному продукту или способу. Настоящее изобретение также включает варианты осуществления, в которых больше одного или все представители группы присутствуют, используются или иным образом относятся к указанному продукту или способу. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает все вариации, комбинации и сочетания, в которых одно или более ограничений, элементов, условий, описательных терминов и т.д. из одного или более перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы изобретения, зависимый от того же независимого пункта формулы изобретения (или любого другого пункта формулы изобретения, в зависимости от того, что применимо), если не указано иное или если среднему специалисту в данной области техники не будет очевидно, что будет возникать противоречие или несоответствие. Если элементы представлены в виде перечней (например, в виде группы Маркуша или в сходном формате), следует понимать, что также раскрывается каждая подгруппа элементов, и любой(ые) элемент(ы) можно удалить из группы. В большинстве случаев следует понимать, что если настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения обозначается/обозначаются как содержащее/содержащие конкретные элементы, признаки и т.д., то определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят или, по сути, состоят из таких элементов, признаков и т.д. Для целей упрощения, такие варианты осуществления были не в каждом случае так подробно конкретно изложены в данном документе. Также следует понимать, что любой вариант осуществления или аспект настоящего изобретения можно точно исключить из формулы изобретения, независимо от того, изложено ли конкретное исключение в описании. Публикации, веб-сайты и другие ссылочные материалы, приводимые в данном документе в качестве ссылки для описания уровня техники настоящего изобретения и для предоставления дополнительной информации касательно его практической реализации, включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ изменения профиля иммуногенности сконструированного полипептида гемагглютини-на (НА), где указанный сконструированный полипептид НА имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотных последовательностей полипептидов НА, встречающихся в природных изолятах гриппа, причем указанный способ включает

а) выявление наличия или отсутствия, по сравнению с соответствующей областью головки полипептида НА с отличимым профилем иммуногенности, одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования в области головки сконструированного полипептида НА, где область головки представляет собой сегмент сконструированного полипептида НА в положениях, соответствующих остаткам 63-278, 125-277 или 135-269 из SEQ ID NO: 1;

б) введение в область головки сконструированного полипептида НА одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования или встраивания дополнительных сайтов N-гликозилирования; и

с) введение одной или более аминокислотных замен в пределах 15 ангстрем от сайта связывания с рецептором (RBS) сконструированного полипептида НА, причем RBS содержит все аминокислотные остатки в пределах 15 ангстрем от положения, соответствующего W167 последовательности SEQ ID NO: 2 в трехмерной (3D) структуре, и/или введение вставки остатка лизина (K) или аргинина (R) в петлю или петли, ограничивающие RBS сконструированного полипептида НА,

за счет чего обеспечивается получение переконструированного полипептида НА с измененным профилем иммуногенности по сравнению со сконструированным полипептидом НА,

причем измененный профиль иммуногенности переконструированного полипептида НА включает увеличение связывания одного или более моноклональных антител к головке в отношении сезонных и/или пандемических штаммов вируса гриппа и/или увеличение спектра связывания для моноклональных антител к области головки в отношении пандемических штаммов вируса гриппа.

2. Способ по п.1, где один или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования или дополнительных сайтов N-гликозилирования определяются консенсусной последовательностью NxS/Ty, где x и y не представляют собой пролин (P).

3. Способ по п.2, где одна или более аминокислотных замен, делеций или вставок для разрушения одного или более предполагаемых сайтов N-гликозилирования предусматривают модификацию консен-

сусной последовательности NxS/Ту в $z^1z^2z^3z^4$, где

z^1 представляет собой N, D, K или S;

z^2 представляет собой Y или остается без изменений;

z^3 представляет собой E, D или N; и

z^4 представляет собой I, L, P, S или T или остается без изменений.

4. Способ по п.2 или 3, где остаток лизина (K) или аргинина (R) вводят в сконструированный полипептид HA в пределах 1-5 аминокислот от консенсусной последовательности NxS/Ту.

5. Способ по любому из пп.1-4, где один или более предполагаемых сайтов N-связанного гликозилирования находятся в положениях, которые соответствуют положениям 142-145 и/или 177-179 в SEQ ID NO: 2.

6. Способ по любому из пп.1-5, где остаток лизина (K) или аргинина (R) вводят в сконструированный полипептид HA в положении, соответствующем остатку 147 последовательности SEQ ID NO: 2, или вблизи него.

7. Способ по любому из пп.1-6, где стадия (с) включает введение одной или более аминокислотных замен в сконструированный полипептид HA в положениях в пределах области, охватывающей остаток, соответствующие остаткам 60-291 последовательности SEQ ID NO: 2.

8. Способ по любому из пп.1-7, где RBS содержит эпитоп, связываемым паратопом моноклонального антитела CH65.

9. Способ по любому из пп.1-8, где профиль иммуногенности переконструированного полипептида HA является более пандемическим, чем у сконструированного полипептида HA.

10. Способ по любому из пп.1-8, где профиль иммуногенности переконструированного полипептида HA является более сезонным, чем у сконструированного полипептида HA.

11. Способ по любому из пп.1-10, где переконструированный полипептид HA содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок в положениях, соответствующих остаткам 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213, 214, 244, 245 и/или 262 последовательности SEQ ID NO: 2.

12. Способ по любому из пп.1-11, где переконструированный полипептид HA содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок в положениях, соответствующих остаткам 137, 144, 145, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 177, 210, 211, 212, 213 и/или 214 последовательности SEQ ID NO: 2.

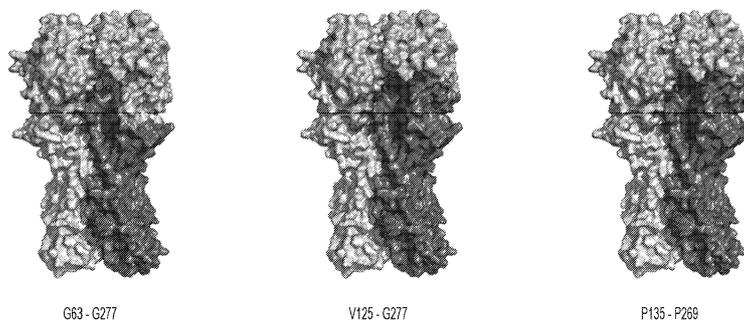
13. Способ по любому из пп.1-12, дополнительно включающий оценку экспрессии и конформации переконструированного полипептида HA.

14. Способ по любому из пп.1-13, дополнительно включающий определение того, обеспечивает ли переконструированный полипептид HA выработку нейтрализующих антител против как сезонных, так и пандемических штаммов вируса гриппа.

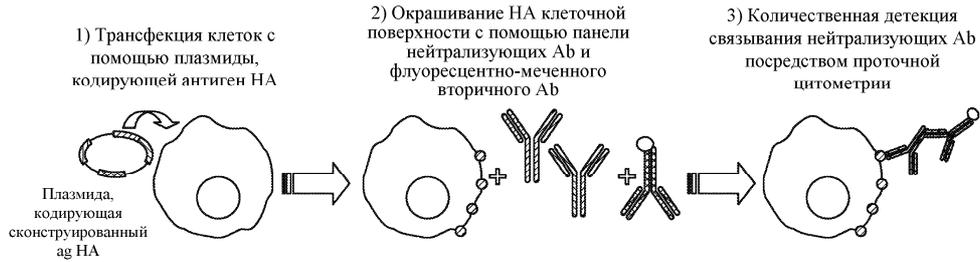
15. Способ по любому из пп.1-14, где увеличение показателей связывания определяют посредством детекции с помощью проточной цитометрии моноклональных антител, связанных с переконструированными полипептидами HA, экспрессируемыми на поверхности клеток млекопитающих.

16. Способ по п.15, дополнительно включающий количественное определение уровня связывания моноклонального антитела.

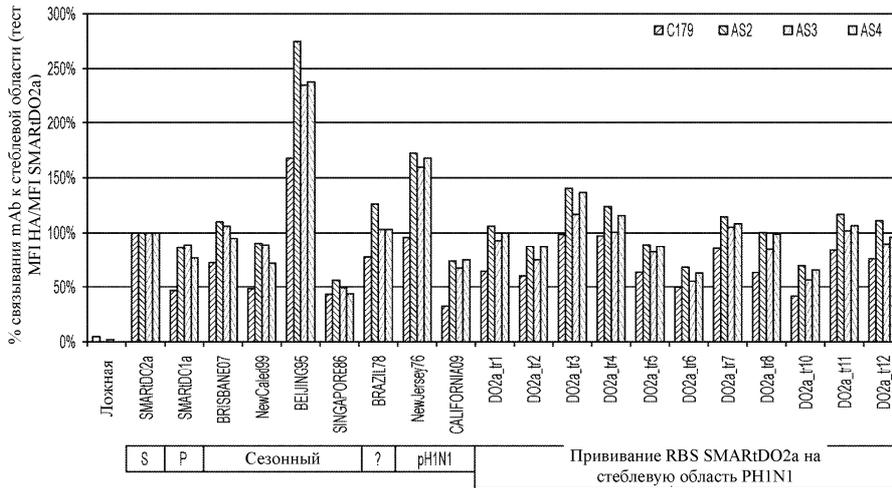
17. Способ по любому из пп.1-16, где сконструированный полипептид HA сконструирован с помощью технологии оптимизированных вычислительными методами антигенов, обеспечивающих широкий спектр реактивности (COBRA), технологии создания мозаиков, удаления и/или перестройки структурных доменов, замены доменов или комбинаций нейтрализующих или перекрестно-реактивных эпитопов, характерных для нескольких штаммов вируса гриппа.



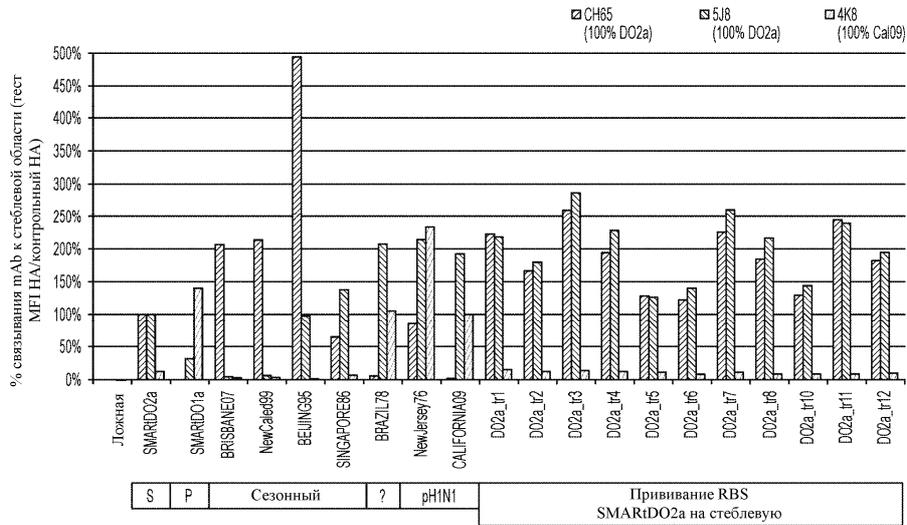
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



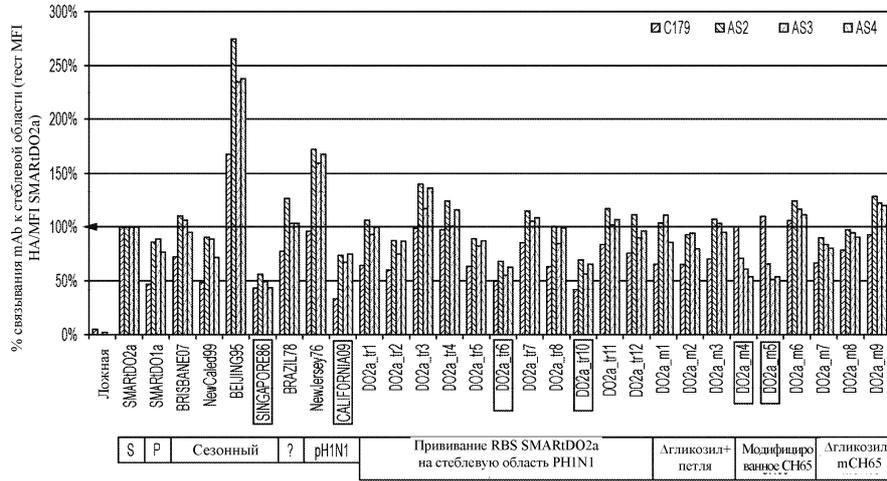
Фиг. 4

	mAb	SMARTDO2a	DO2a_tr5	DO2a_tr6	DO2a_tr7	DO2a_tr8
Стеблевая область	AS2	582	558	386	612	643
	AS3	757	664	393	654	620
Область головки	AN4	814	1266	928	1774	1431
	AN5	945	1371	1100	2030	1654
	CH65	613	952	865	1955	1301
	5J8	373	681	670	1321	1086
	4K8	120	128	82	108	96

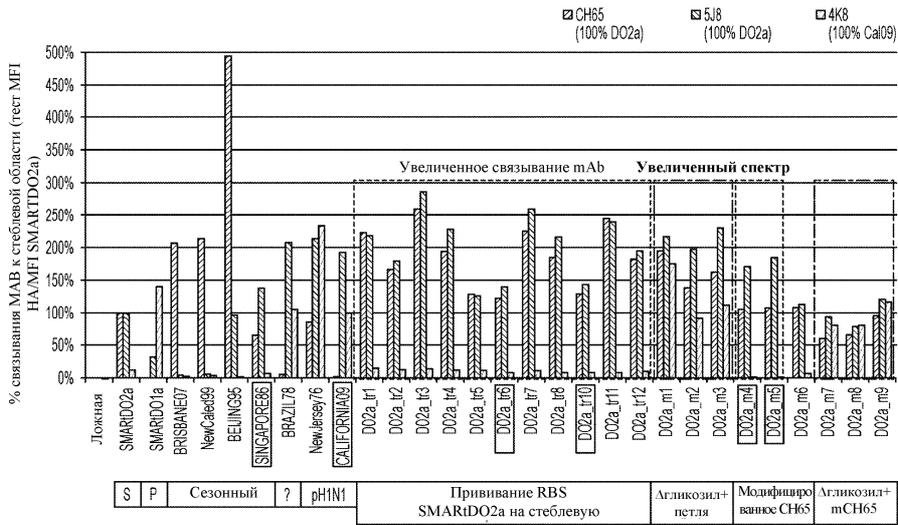
Фиг. 5



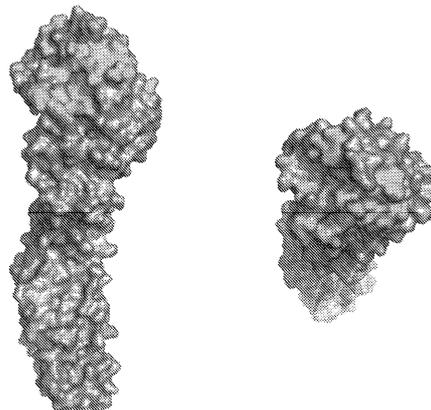
Фиг. 6



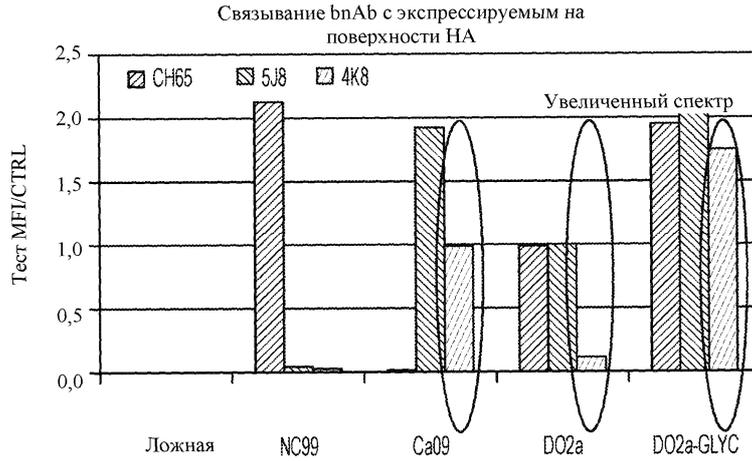
Фиг. 7



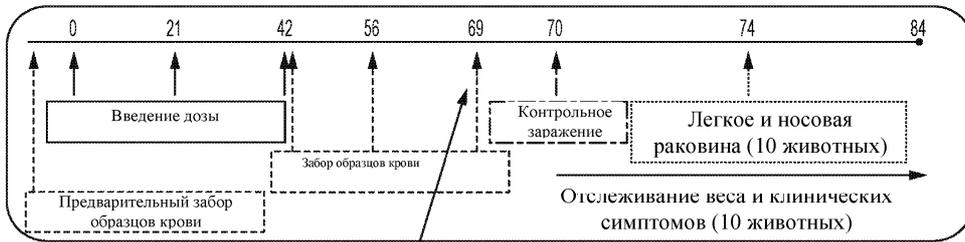
Фиг. 8



Фиг. 9

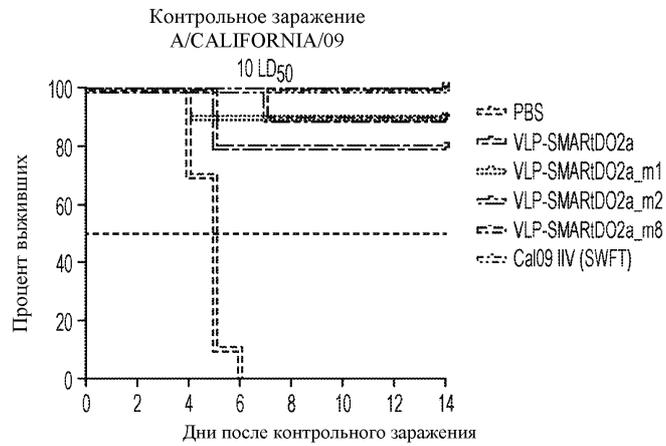


Фиг. 10

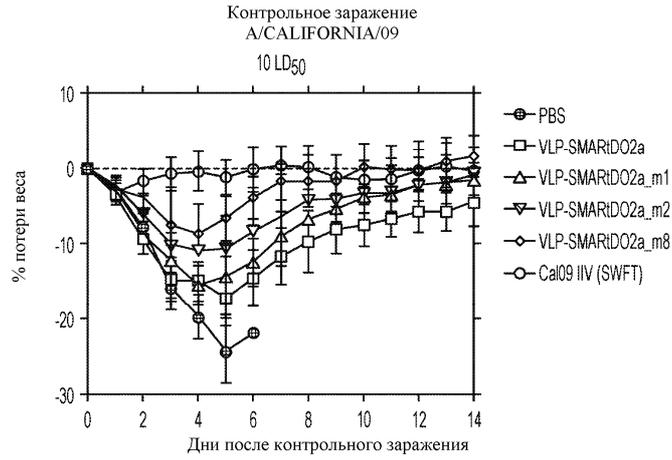


Умерщвление 4 животных для последнего забора образцов крови (можно применять для исследований пассивного переноса)

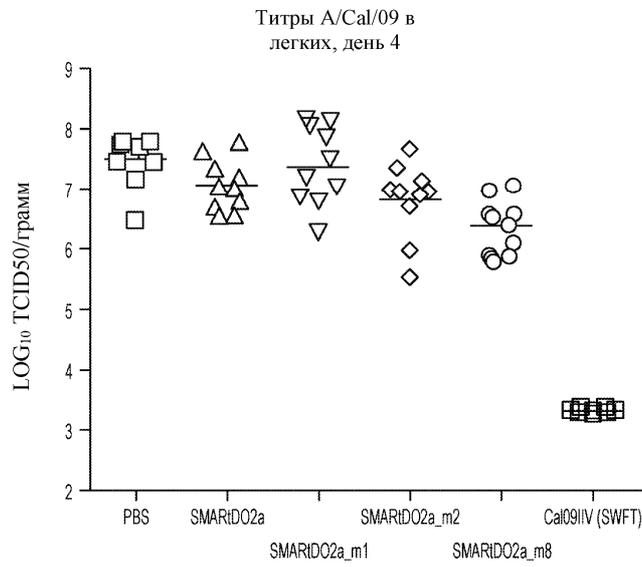
Фиг. 11



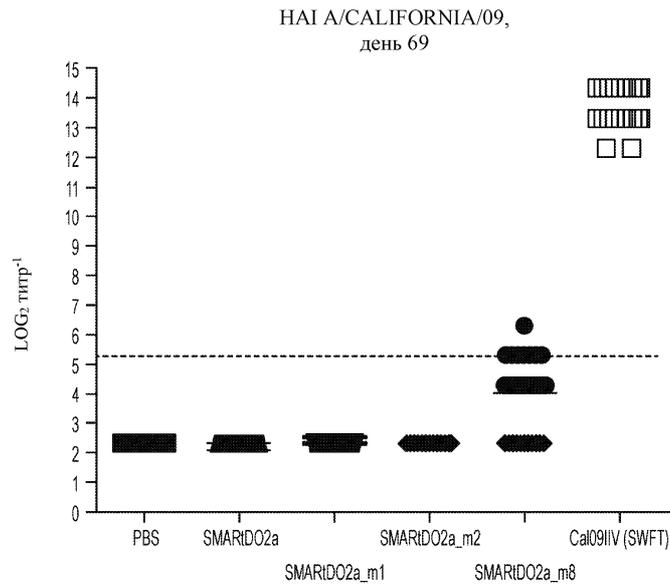
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

