

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045051**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/145* (2006.01)

(21) Номер заявки
202091769

(22) Дата подачи заявки
2019.01.22

(54) **ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**(31) **18152991.8**(32) **2018.01.23**(33) **EP**(43) **2020.10.16**(86) **PCT/EP2019/051532**(87) **WO 2019/145310 2019.08.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Милдер Фердинанд Якобус,
Ричель Тина, Бранденбург Буррис,
Йонгенселен Манди Антония
Катарина, Трюан Дафне, Лангедейк
Йоханнес Петрус Мария (NL)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) G. BOMMAKANTI ET AL.: "Design of Escherichia coli-Expressed Stalk Domain Immunogens of H1N1 Hemagglutinin That Protect Mice from Lethal Challenge", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 86, no. 24, 26 September 2012 (2012-09-26), pages 13434-13444, XP055100077, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01429-12 abstract; figure 2, page 13436, left-hand column, paragraph 1

Y. LU ET AL.: "Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 16 December 2013 (2013-12-16), XP055095011, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1308701110, abstract; figures 1-5

PETER S. LEE ET AL.: "Design and Structure of an Engineered Disulfide-Stabilized Influenza Virus Hemagglutinin Trimer", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 89, no. 14, 29 April 2015 (2015-04-29), pages 7417-7420, XP055480679, US, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00808-15, abstract; figure 2

JOHN STEEL ET AL.: "Influenza Virus Vaccine Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain", MBI, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 1, no. 1, 18 May 2010 (2010-05-18), pages e00018-10, XP002675042, ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/MBIO.00018-10, abstract; figure 1, page 2, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1

SOPHIE A. VALKENBURG ET AL.: "Stalking influenza by vaccination with pre-fusion headless HA mini-stem", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 7 March 2016 (2016-03-07), XP055482479, DOI: 10.1038/srep22666, abstract; figure 1, page 2, paragraph 3

WO-A1-2013079473

(57) Изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, нуклеиновым кислотам, кодирующим указанные полипептиды, векторам, содержащим указанную нуклеиновую кислоту, и фармацевтическим композициям, содержащим их, а также способам их применения, в частности в профилактике и/или лечении инфекций вируса гриппа.

B1**045051****045051 B1**

Введение

Настоящее изобретение относится к области медицины. В данном документе представлены полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (НА) вируса гриппа А, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные полипептиды, фармацевтические композиции, содержащие их, и способы их применения.

Предпосылки изобретения

Вирусы гриппа являются основными патогенами человека, вызывающими респираторное заболевание (обычно называемое "гриппом"), тяжесть которого варьирует в пределах от субклинической инфекции до первичной вирусной пневмонии, которая может привести к смерти. Клинические эффекты инфекции различаются в зависимости от вирулентности штамма вируса гриппа и воздействия, истории болезни, возраста и иммунного статуса хозяина. По оценкам, ежегодно приблизительно 1 миллиард человек во всем мире подвергается инфицированию вирусом гриппа, что приводит к тяжелой болезни в 3-5 миллионах случаев и ориентировочно от 300000 до 500000 смертей, связанных с гриппом. Большую часть этих инфекций можно отнести к вирусам гриппа А, несущим подтипы Н1 или Н3 гемагглютинина, при меньшем вкладе вирусов гриппа В, и, следовательно, их представителей обычно включают в сезонную вакцину. Современная практика иммунизации основана на ранней идентификации циркулирующих вирусов гриппа для обеспечения своевременного получения эффективной сезонной вакцины против гриппа. Помимо неизбежных трудностей в прогнозировании того, какие штаммы будут преобладать во время следующего сезона, в неспособности современных вакцин предупредить заболеваемость и смертность также играют роль устойчивость к противовирусным препаратам и ускользание от иммунного ответа. Кроме того, возможность пандемии, вызванной высоковирулентным штаммом вируса, происходящим из животных-резервуаров и реассортированным с увеличением распространения от человека к человеку, все еще представляет собой значительную и реальную угрозу для глобального здравоохранения.

Вирусы гриппа представляют собой оболочечные РНК-содержащие вирусы, которые принадлежат к семейству Orthomyxoviridae. Их геномы состоят из восьми однонитевых сегментов РНК, которые кодируют 11 различных белков: один нуклеопротеин (NP), три полимеразных белка (PA, PB1 и PB2), два белка матрикса (M1 и M2), три неструктурных белка (NS1, NS2 и PB1-F2) и два наружных гликопротеина гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA).

Вирусы гриппа А широко распространены в природе и могут инфицировать множество птиц и млекопитающих. Вирусы классифицируют на основании различий в антигенной структуре белков HA и NA, при этом их различные комбинации представляют уникальные подтипы вируса, которые дополнительно классифицируют на конкретные штаммы вируса гриппа. Хотя все известные подтипы можно обнаружить у птиц, циркулирующими в настоящее время подтипами вируса гриппа А человека являются H1N1 и H3N2. Филогенетический анализ вирусов гриппа А продемонстрировал подразделение гемагглютининов на две основные так называемые филогенетические группы: помимо прочих, подтипы H1, H2, H5 и H9 в филогенетической группе 1 (вирусы группы 1), и, помимо прочих, подтипы H3, H4 и H7 в филогенетической группе 2 (вирусы группы 2).

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

Известно, что антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, направлены главным образом на гемагглютинин (HA). Гемагглютинин или HA представляет собой тримерный гликопротеин, который закорен в вирусной мембране и имеет двойную функцию: он отвечает за связывание с рецепторами клеточной поверхности, содержащими сиаловую кислоту, а после поглощения он опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембраны, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитозоль клетки-мишени. HA содержит крупный головной домен и меньший стеблевой домен. Стеблевой домен закорен в вирусной мембране с помощью последовательности С-концевого трансмембранного домена. Белок подвергается посттрансляционному расщеплению с получением двух полипептидов HA - HA1 и HA2 (полную последовательность называют HAO) (фиг. 1А). Мембранно-дистальная головная область в основном образована из HA1, а мембранно-проксимальная стеблевая область - главным образом из HA2. Расщепление молекулы-предшественника HA HAO необходимо для активации инфекционности вируса, и распределение активирующих протеаз в хозяине является одной из детерминант патогенности вируса гриппа. HA вирусов млекопитающих и непатогенных вирусов птиц расщепляются внеклеточно, что ограничивает их распространение в хозяевах тканями, где встречаются соответствующие протеазы. В то же время HA патогенных вирусов расщепляются внутриклеточно повсеместно встречающимися протеазами и поэтому обладают способностью инфицировать различные типы клеток и вызывать системные инфекции.

Причиной, по которой сезонная вакцина против гриппа должна обновляться каждый год, является значительная изменчивость вируса. В белке HA эта изменчивость особенно проявляется в головном до-

мене, где антигенный дрейф и шифт привели к образованию большого количества различных вариантов. Поскольку он также представляет собой зону, которая является иммунодоминантной, большинство нейтрализующих антител направлены на данный домен и действуют путем препятствования связыванию с рецептором. Сочетанием иммунодоминантности и значительной изменчивости головного домена объясняется то, что инфицирование определенным штаммом не приводит к иммунитету к другим штаммам: антитела, выработанные в результате первого инфицирования, распознают лишь ограниченное число штаммов, близкородственных вирусу, вызвавшему первичную инфекцию.

Недавно полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа, в которых отсутствует весь глобулярный головной домен гемагглютиниона вируса гриппа или существенная его часть, были описаны и были применены для формирования иммунного ответа на один или несколько консервативных эпитопов полипептида стеблевого домена. Полагают, что эпитопы полипептида стеблевого домена являются менее иммуногенными, чем высокоиммуногенные области глобулярного головного домена, и поэтому отсутствие глобулярного головного домена в полипептиде стеблевого домена может обеспечить возможность развития иммунного ответа на один или нескольких эпитопов полипептида стеблевого домена (Steel et al., 2010). Steel et al., таким образом, создали полипептид стеблевого домена HA вируса гриппа посредством делеции аминокислотных остатков 53-276 из домена HA1 штаммов A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) и A/Hong Kong/1968 (H3N2) и замещения подвергнутой делеции последовательности короткой гибкой линкерной последовательностью GGGG. Вакцинация мышей конструкцией H3/HK68 не приводила к выработке антисывороток, которые перекрестно реагировали с HA группы 1. Кроме того, как показано в WO 2013/079473, полипептиды стеблевого домена были нестабильными и не принимали правильную конформацию, что доказано отсутствием связывания антител, которые, как было показано, связываются с консервативными эпитопами в стеблевой области.

Vommakanti et al. (2010) описали полипептид на основе HA2, содержащий аминокислотные остатки 330-501 (HA2), 7-аминокислотный линкер (GSAGSAG), аминокислотные остатки 16-55 из HA1, 6-аминокислотный линкер GSAGSA с последующими остатками 290-321 из HA1, с мутациями V297T, I300E, Y302T и C305T в HA1. В основе данной разработанной структуры лежала последовательность HA H3 (A/Hong Kong/1968). Полипептид обеспечивал перекрестную защиту только от другого штамма вируса гриппа в пределах подтипа H3 (A/Phil/2/82), но не от подтипа H1 (A/PR/8/34). В более ранней статье Vommakanti et al. (2012) был описан полипептид стеблевого домена на основе HA из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (H1NA0HA6). В этом полипептиде был подвергнут делеции эквивалент аминокислотных остатков 48-288 и были произведены мутации I297T, V300T, I302N, C305S, F392D, F395T и L402D. Полипептиды на основе как H3, так и H1 экспрессировались в *E. coli*, и, следовательно, в них отсутствовали гликаны, которые являются частью встречающихся в природе белков HA.

Совсем недавно Lu et al. (2014) также описали растворимые полипептиды стеблевого домена, полученные из HA H1N1 A/California/05/2009. В конечной разработанной структуре были подвергнуты делеции аминокислотные остатки от 52 до 277 (лидерная последовательность также отсутствует) и были введены две мутации в В-петлю белка, т.е. F392D и L402D. Кроме того, полипептид содержал С-концевой тримеризационный домен (фолдон). Кроме того, были введены два межмономерных дисульфидных мостика - один в зоне тримерного домена фолдона и один в положениях 416 и 417 (т.е. G416C и F417C согласно нумерации H3). Полипептид вырабатывался в бесклеточной системе на основе *E. coli* (и поэтому в нем отсутствуют гликаны, которые являются частью встречающихся в природе белков HA) и извлекался в денатурированной форме, которую необходимо подвергнуть рефолдингу перед применением. Подвергнутый рефолдингу белок не мог связывать нейтрализующее антитело широкого спектра действия (bnAb) CR6261, которое связывается с консервативным конформационным эпитопом стеблевого домена. Никаких иммунологических данных или данных о защите при контрольном заражении вирусом гриппа не было представлено.

В другой статье Mallajosyula et al. (2014) также был описан полипептид стеблевого домена HA вируса гриппа. В этой разработанной структуре на основе HA из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 делеции была подвергнута не только большая часть последовательности HA1 (остатки 48-289, нумерация H3), но также большая часть N- и С-концевых последовательностей HA2 (остатки 323-369 и от 443 до конца соответственно). Полипептид содержал тримеризационный домен фолдон на С-конце и также вырабатывался в *E. coli*, поэтому в нем отсутствуют гликаны, встречающиеся в природе в вирусном HA. Было показано, что полипептид связывает bnAb CR6261, F10 и FI6v3 и защищает мышей от летального контрольного заражения вирусом гриппа (1LD90 H1N1 A/Puerto Rico/8/1934). Эквивалентные полипептиды, полученные из HA H1N1 A/New Caledonia/20/1999 и H1N1 A/California/04/2009, также могли обеспечивать частичную защиту. Полипептид, полученный из H5N1 A/Viet Nam/1203/2004, предоставлял лишь ограниченную защиту в данной модели контрольного заражения. Более того, контрольное заражение в используемой модели являлось легким при относительно низкой вводимой дозе (1-2 LD90).

Наконец, Yassine et al. (2015) также описали разработку стабилизированного полипептида стеблевого домена HA, полученного из HA H1N1 A/New Caledonia/20/1999. В этой разработанной структуре большая часть последовательности HA1 (остатки 43-313, нумерация H3) и последовательности HA2 (остатки от 504 до конца) была подвергнута делеции. Кроме того, разработанная структура содержит две

стабилизирующие мутации (K380M и E432L) в HA2 и является генетически слитой с субъединицей ферритина Н. рylog₁ с созданием самособирающихся наночастиц, на которых представлен стабилизированный полипептид стеблевого домена HA. Стабилизированный полипептид стеблевого домена HA, по видимому, является нерастворимым и не функционирует без слияния с субъединицей ферритина. Слитый полипептид стеблевой домен HA-ферритин, собранный в виде наночастиц, был протестирован в модели контрольного заражения гетеросубтипическим вирусом гриппа H5N1 2004 VN (25×LD₅₀ и 1000×TCID₅₀ у мышей и хорьков соответственно) и мог защищать мышей от гибели, тогда как у хорьков наблюдалась лишь частичная защита. Неясно, насколько сильный ферритиновый ответ будет индуцироваться у людей, и какой эффект будет иметь место при многократных введениях.

Таким образом, все еще существует потребность в безопасной и эффективной "универсальной" вакцине, которая стимулирует формирование устойчивого ответа с образованием нейтрализующих антител широкого спектра действия и которая обеспечивает защиту от широкого набора существующих и будущих штаммов вируса гриппа (как сезонного, так и пандемического), в частности, в вакцине, которая обеспечивает защиту от одного или нескольких подтипов вируса гриппа А в пределах филогенетической группы 1 и/или группы 2, для эффективного предупреждения и/или лечения гриппа.

Краткое описание

В настоящем изобретении представлены новые полипептиды, полученные из гемагглютинина (HA) вируса гриппа, при этом полипептиды содержат стеблевой домен HA вируса гриппа и не содержат глобулярную головную область и называются в данном документе полипептидами стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа. Полипептиды индуцируют иммунный ответ на HA при введении субъекту, в частности, субъекту-человеку. Полипептиды по настоящему изобретению презентуют консервативные эпитопы мембранно-проксимального стеблевого домена молекулы HA иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, присутствующих в мембранно-дистальном головном домене. Таким образом, часть первичной последовательности белка HAO, т.е. часть, составляющая головной домен, была подвергнута делеции, а оставшаяся аминокислотная последовательность была заново соединена непосредственно либо, в некоторых вариантах осуществления, посредством введения короткой гибкой линкерной последовательности ("линкера") для восстановления непрерывности аминокислотной цепи. Полученную аминокислотную последовательность далее модифицируют путем введения специфических модификаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы HA.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа А группы 1, содержащим домены HA1 и HA2, при этом указанные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, которая предусматривает, по сравнению с аминокислотной последовательностью полноразмерного полипептида HA, содержащего домены HA1 и HA2:

- (i) делецию головной области в домене HA1;
- (ii) модификацию тримеризационной области в домене HA2, предпочтительно модификацию в С-спирали,
- (iii) по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих (способных образовывать) внутримonomерный дисульфидный мостик;
- (iv) по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих (способных образовывать) межмономерный дисульфидный мостик;

где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392, представляет собой Р, R или Y, предпочтительно Р или R, и аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 434, представляет собой Q, и где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации H3, используемой у Winter et al. (1981).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа А группы 1, содержащим домены HA1 и HA2, где указанные полипептиды стеблевого домена HA содержат аминокислотную последовательность, которая предусматривает, по сравнению с аминокислотной последовательностью полноразмерного полипептида HA (HAO), содержащего домены HA1 и HA2:

- (i) делецию головной области в домене HA1, при этом указанная делеция охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 53, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 302, включительно;
- (ii) модификацию тримеризационной области в домене HA2, предпочтительно модификацию тримеризационной области в С-спирали, при этом указанная тримеризационная область содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 405, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 419, включительно;
- (iii) цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, и цистеин в положении, соответствующем положению 422, образующие (способные образовывать) внутримonomерный дисульфидный мостик;
- (iv) цистеин в положении, соответствующем положению 397, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 405; или цистеин в положении, соответствующем положению 396, в

комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408; или цистеин в положении, соответствующем положению 399, в комбинации с цистеином в положении 405;

где аминокислота в положении, соответствующем положению 392, представляет собой Р, R или Y, предпочтительно Р или R, и где аминокислота в положении, соответствующем положению 434, представляет собой Q; и где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации H3, используемой у Winter et al. (1981).

В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было показано, что новые полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа по настоящему изобретению могут экспрессироваться на высоких уровнях, в подавляющем большинстве случаев являются тримерными в надосадочной жидкости культуры клеток, имеют повышенную температуру плавления, что приводит к большей стабильности. Кроме того, полипептиды стеблевого домена HA по настоящему изобретению имитируют стеблевой домен полноразмерного HA посредством стабильной презентации эпитопа для bnAb, связывающих стеблевой домен HA, таких как CR9114 и/или CR6261.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении представлены векторы, в частности, рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены способы индукции иммунного ответа на HA вируса гриппа у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту полипептида стеблевого домена HA вируса гриппа, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции, содержащие полипептид стеблевого домена HA вируса гриппа, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа, и/или векторы, содержащие указанные молекулы нуклеиновой кислоты, для применения в качестве лекарственного препарата, в частности, для применения в качестве вакцины для предупреждения и/или лечения заболевания или состояния, вызванного штаммом вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и/или 2 и/или штаммом вируса гриппа В.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. А. Схематическое представление полипептидов по настоящему изобретению. В. В результате удаления головной области HA образуются полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению (мини-HA). С. Трехмерное представление полипептида на основе стеблевого домена по настоящему изобретению.

Фиг. 2. Схематическое изображение исходной конструкции 5367 на основе A/Brisbane.

Фиг. 3. Схематическое изображение исходной конструкции 5369 на основе A/Brisbane.

Фиг. 4. Схематическое изображение варианта осуществления полипептида по настоящему изобретению, в котором показаны новая мутация аминокислоты в положении 392 в В-петле по типу замены на Р или R, мутация аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q и мутация в положении 442 по типу замены на А и который дополнительно содержит мутацию аминокислоты в положении 404 по типу замены на Q.

Фиг. 5. Уровни экспрессии и содержание тримеров для некоторых полипептидов по настоящему изобретению (серым цветом) и исходных разработок (черным цветом). А - уровни экспрессии белка, определенные с помощью ОСТЕТ (CR9114); В и С - содержание тримеров, определенное с помощью AlphaLISA (значения выражены в % относительно полипептида UFV160656, который принят за 100%; значение для полипептида 5367 является оценкой на основе вестерн-блоттинга). Эксперимент выполняли несколько раз, и эти данные являются иллюстративными для наблюдаемых значений. Стабилизирующие мутации показаны на левых панелях.

Фиг. 6. Объединенные фракции, элюированные в ходе аффинной хроматографии, разделенные с помощью эксклюзионной хроматографии; указаны агрегаты, тримеры и мономеры (панели А и В). Анализ методом SEC-MALS объединенной фракции тримеров указывает на то, что полипептид по настоящему изобретению является очень чистым и однородным по молярной массе (панель С).

Фиг. 7. SEC-профили тримерного полипептида стеблевого домена по настоящему изобретению и Fab-фрагментов. На совмещенном графике показаны хроматограммы полипептида (черным цветом), Fab-фрагмента (пунктиром) и образца, содержащего их оба (серым цветом). Представлены результаты для полипептида 160656. Перекрывающиеся пики на панели А указывают на то, что Fab, используемый в качестве отрицательного контроля, не связывается с полипептидом, тогда как полипептиды, предварительно инкубированные с Fab6261 (панель В) и Fab9114 (панель С), демонстрируют сдвиг пика (уменьшение времени удерживания), указывающий на образование комплекса (один тример, связанный тремя Fab-фрагментами).

Фиг. 8. Схематическое представление удаления головного домена HA (HA1). В исходной разработанной структуре головной домен удаляют, и два конца HA1 соединяют искусственным "линкером GGGG" (левая панель). В полипептидах по настоящему изобретению концы соединяют непосредственно (альтернативное положение разрезания) или с помощью гомологичной линкерной последовательности, происходящей из головного домена.

Фиг. 9. Уровни экспрессии, связывание антител и содержание тримеров для полипептидов по настоящему изобретению, определенные с помощью AlphaLISA. А - уровни экспрессии, В - связывание CR9114 и С - содержание тримеров. Разработанные структуры, содержащие альтернативные разрезы, показаны серым цветом (левая панель), разработанные структуры, содержащие альтернативные линкеры, показаны светло-серым цветом. Все данные нормализованы относительно эталонной разработанной структуры UFV160360 (черным цветом).

Фиг. 10. Уровни экспрессии и тримеризация полипептидов по настоящему изобретению. Уровни экспрессии определяли с помощью ОСТЕТ (панель А), а содержание тримеров - с помощью AlphaLISA (панель В). Данные нормализованы относительно эталонного полипептида UFV150850.

Фиг. 11. Нормализованные уровни экспрессии, содержание тримеров и связывание CR9114. Образцы надосадочной жидкости культуры анализировали с помощью AlphaLISA. Эталонная конструкция UFVI60097 содержит GCN4-подобный гептадный повтор и показана черным цветом, тогда как полипептид, содержащий альтернативный гептадный повтор, показан серым цветом. Уровни связывания CR9114 нормализовали по определенному уровню экспрессии.

Фиг. 12. Экспрессия и связывание антител с вариантами полипептидов с альтернативными С-концевыми усечениями. А - вестерн-блот с использованием однодоменного антитела, специфичного к HA. Почти все образцы демонстрируют четкую полосу на высоте, соответствующей тримерам, которая аналогична обоим эталонным полипептидам (UFV5367 и UFV5369). В - связывание полипептидов с нейтрализующим антителом широкого спектра действия CR9114, определенное с помощью ОСТЕТ, где показаны относительные значения K_{on} полипептидов по сравнению с эталонными разработанными структурами UFV5367 и UFV5369.

Фиг. 13. Нормализованные уровень экспрессии, содержание тримеров и связывание CR9114. Образцы надосадочной жидкости культуры анализировали с помощью AlphaLISA. Эталонная конструкция UFV160090 показана черным цветом, тогда как полипептид, содержащий введенные цистеиновые остатки в альтернативных положениях, показан серым цветом. Содержание тримеров и уровни связывания CR9114 нормализовали, исходя из определенного уровня экспрессии.

Фиг. 14. Нумерация аминокислотных положений в H1 A/California/07/09 и в UFV160664 согласно нумерации H3 из Winter et al. (1981).

Фиг. 15. Титры антитела, специфичного к FL HA H1 A/Brisbane/59/07, после иммунизации мышей полипептидами по настоящему изобретению. Пунктирной линией указан LLOQ (нижний предел количественного определения), горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 16. Верхняя панель: доля выживших на протяжении периода последующего наблюдения после контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07 мышей, иммунизированных полипептидами по настоящему изобретению. Нижняя панель: относительная масса тела на протяжении периода последующего наблюдения после контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07 мышей, иммунизированных полипептидами по настоящему изобретению. Изменение относительной массы тела выражали относительно дня 0. Совокупную потерю массы тела на протяжении периода последующего наблюдения определяли путем расчета площади под кривой (AUC). Планки погрешностей обозначают 95% доверительный интервал.

Фиг. 17. Верхняя панель: доля выживших на протяжении периода последующего наблюдения после контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34 мышей, иммунизированных полипептидами по настоящему изобретению. Нижняя панель: относительная масса тела на протяжении периода последующего наблюдения после контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34 мышей, иммунизированных полипептидами по настоящему изобретению. Изменение относительной массы тела выражали относительно дня 0. Совокупную потерю массы тела на протяжении периода последующего наблюдения определяли путем расчета площади под кривой (AUC). Планки погрешностей обозначают 95% доверительный интервал.

Фиг. 18. Титры антитела, специфичного к FL HA H1 A/California/07/09, после иммунизации хорьков полипептидами по настоящему изобретению. Статистическое сравнение различных доз полипептида по настоящему изобретению и SOC с группой, получавшей только адьювант, с использованием ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, начиная с наиболее высокой дозы, и с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Пунктирными линиями указаны ULLOQ (верхний предел количественного определения) и LLOQ. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 19. Титры антитела, специфичного к стеблевому домену FL HA H1 A/California/07/09, после иммунизации хорьков полипептидами по настоящему изобретению. Статистическое сравнение различных доз полипептида по настоящему изобретению и SOC с группой, получавшей только адьювант, с использованием ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, начиная с наиболее

высокой дозы, и с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 20. Титры вирусной нагрузки в легких в конце периода последующего наблюдения (день 4 после контрольного заражения) после иммунизации хорьков полипептидами по настоящему изобретению с последующим контрольным заражением H1N1 A/NL/602/09. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе, незакрашенные символы обозначают образцы на пределе выявления (LOD).

Фиг. 21. Выживание на протяжении 5-дневного периода последующего наблюдения у хорьков, иммунизированных полипептидами по настоящему изобретению, FL HA H5 (положительный контроль контрольного заражения) и только адьювантом (отрицательный контроль контрольного заражения), с последующим контрольным заражением H5N1 A/Indonesia/05/05.

Фиг. 22. Совокупная (AUC) потеря массы тела у отдельных животных, полученная в результате последовательных ежедневных измерений массы тела на протяжении периода последующего наблюдения (дни 0-5), относительно массы тела в день 0 после иммунизации хорьков полипептидами по настоящему изобретению с последующим контрольным заражением H5N1 A/Indonesia/05/05. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 23. Титры вирусной нагрузки в легких в день смерти или в конце периода последующего наблюдения (день 5 после контрольного заражения) после иммунизации хорьков полипептидами по настоящему изобретению с последующим контрольным заражением H5N1 A/Indonesia/05/05. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе, незакрашенные символы обозначают образцы на пределе выявления (LOD).

Фиг. 24. Совокупная (AUC) вирусная нагрузка в горле, полученная по результатам последовательного ежедневного взятия мазков из зева на протяжении периода последующего наблюдения (дни 0-5), относительно массы тела в день 0 после иммунизации хорьков полипептидами по настоящему изобретению с последующим контрольным заражением H5N1 A/Indonesia/05/05. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 25. Титры антитела, специфичного к FL HA H1 A/California/07/09, после иммунизации мышей полипептидами по настоящему изобретению. Пунктирной линией указан LLOQ (нижний предел количественного определения), незакрашенные символы представляют образцы на LLOQ, горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 26. Титры антитела, специфичного к стеблевому домену FL HA H1 A/California/07/09, после иммунизации мышей полипептидами по настоящему изобретению. Пунктирной линией указан LLOQ (нижний предел количественного определения), незакрашенные символы представляют образцы на LLOQ, горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 27. Т-клетки, вырабатывающие IFN- γ , на миллион спленоцитов иммунизированных мышей после стимуляции *in vitro* пептидами UFV160664. Пунктирной линией указан LLOQ (нижний предел количественного определения), незакрашенные символы представляют образцы на LLOQ, горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе.

Фиг. 28. Получение характеристик *in vitro* образцов надосадочной жидкости культуры ExpiCHO с экспрессированными тримерными полипептидами стеблевого домена, полученными из различных штаммов вируса гриппа группы 1, в которые были перенесены мутации конструкции UFV160664.

A - уровни экспрессии белков, определенные с помощью ОСТЕТ (с антителом к His2); B - SEC-профили, где пики, соответствующие тримерам и мономерам, указаны соответственно как "Т" и "М"; C - кривые связывания полипептидов с mAb CR9114 и MD3606, определенные с помощью AlphaLISA. Мутации тримерного полипептида стеблевого домена по настоящему изобретению из штамма A/California/07/09 могут переноситься в другие остовы из группы 1; экспрессируется тримерный мини-НА, и наблюдается связывание антитела CR9114 и мультидоменного MD3606, специфичных к стеблевому домену.

Определения

Ниже даны определения терминов, используемых в настоящем изобретении.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую из двадцати встречающихся в природе (или "стандартных") аминокислот или их вариантов, таких как, например, D-пролин (D-энантиомер пролина), или любые варианты, которые не обнаруживаются в природе в белках, такие как, например, норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают особыми свойствами, как, например, цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который образует цикл с полипептидным остовом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В табл. 12 показаны сокращения и свойства стандартных аминокислот.

Полагают, что после термина "включенный" или "включающий", используемого в данном докумен-

те, должны следовать слова "без ограничения".

Используемый в данном документе термин "инфекция" означает инвазию, размножение и/или наличие вируса в клетке или в организме субъекта. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой "активную" инфекцию, т.е. такую, при которой вирус реплицируется в клетке или в организме субъекта. Такая инфекция характеризуется распространением вируса в другие клетки, ткани и/или органы из клеток, тканей и/или органов, изначально инфицированных вирусом. Инфекция также может представлять собой латентную инфекцию, т.е. такую, при которой вирус не реплицируется. В определенных вариантах осуществления инфекция относится к патологическому состоянию, обусловленному наличием вируса в клетке или в организме субъекта или инвазией вируса в клетку или в организм субъекта.

Вирусы гриппа обычно классифицируют на типы вируса гриппа: роды А, В и С. Термин "подтип вируса гриппа", используемый в данном документе, относится к вариантам вируса гриппа А, которые характеризуются комбинациями поверхностных белков вируса гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). В соответствии с настоящим изобретением подтипы вируса гриппа могут быть названы по их номеру Н, как, например, "вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3", "вирус гриппа подтипа Н3" или "вирус гриппа Н3", или по комбинации номера Н и номера N, как, например, "подтип Н3N2 вируса гриппа" или "Н3N2". Термин "подтип" включает, в частности, все отдельные "штаммы" в пределах каждого подтипа, которые, как правило, образуются в результате мутаций и демонстрируют различные патогенные профили, в том числе природные изоляты, а также искусственные мутанты или реассортанты и т.п. Такие штаммы также можно называть различными "изолятами" подтипа вируса. Соответственно, используемые в данном документе термины "штаммы" и "изоляты" можно использовать взаимозаменяемо. Существующая номенклатура штаммов или изолятов вируса гриппа человека включает тип (род) вируса, т.е. А, В или С, географическое место первого выделения, номер штамма и год выделения, обычно с описанием антигенов НА и NA, приведенным в скобках, например, А/Moscow/10/00 (Н3N2). Штаммы, отличные от человеческих, также включают в свою номенклатуру хозяина, из которого они происходят.

Подтипы вируса гриппа А можно дополнительно классифицировать с учетом их филогенетической группы. Филогенетический анализ продемонстрировал подразделение гемагглютининов на две основные группы: помимо прочих, подтипы Н1, Н2, Н5 и Н9 в филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1"), и, помимо прочих, подтипы Н3, Н4, Н7 и Н10 в филогенетической группе 2 (вирусы гриппа "группы 2").

Используемый в данном документе термин "заболевание, вызываемое вирусом гриппа" или "грипп" относится к патологическому состоянию, обусловленному наличием вируса гриппа, например, вируса гриппа А или В, у субъекта. Используемые в данном документе термины "заболевание" и "нарушение" используются взаимозаменяемо. В конкретных вариантах осуществления данный термин относится к респираторной болезни, вызываемой инфицированием субъекта вирусом гриппа.

Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекул ДНК (например, кДНК или геномной ДНК) и молекул РНК (например, мРНК), а также аналогов ДНК и РНК, полученных с использованием аналогов нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может быть однонитевой или двухнитевой. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы химическим или биохимическим путем или могут содержать природные или дериватизированные нуклеотидные основания, как будет без труда понятно специалистам в данной области. Такие модификации включают, например, метки, метилирование, замену одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, модификации межнуклеотидных связей, такие как незаряженные связи (например, метилфосфонатные, фосфотриэфирные, фосфорамидатные, карбаматные и т.д.), заряженные связи (например, фосфотиоатные, фосфодитиоатные и т.д.), подвешенные фрагменты (например, полипептиды), интеркаляторы (например, акридин, псорален и т.д.), хелатирующие вещества, алкилирующие вещества и модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.). Упоминание последовательности нуклеиновой кислоты охватывает комплементарную ей последовательность, если не указано иное. Таким образом, упоминание молекулы нуклеиновой кислоты с конкретной последовательностью следует понимать как охватывающее комплементарную ей нить с ее комплементарной последовательностью. Комплементарная нить также применима, например, для антисмысловых терапевтических средств, гибридизационных зондов и праймеров для ПЦР.

Используемая в данном документе нумерация аминокислот в НА основана на нумерации Н3, описанной у Winter et al. (1981). Нумерация аминокислотных остатков или аминокислотных положений, таким образом, относится к нумерации в полноразмерном НА Н3 (в частности, к нумерации аминокислотных положений в А/Aichi/2/68), описанной и показанной на фиг. 2 у Winter et al. (1981). Нумерация, в частности, относится к нумерации аминокислотных положений в SEQ ID NO: 15. Например, выражения "аминокислота в положении 392" или "аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392" (которые используются взаимозаменяемо во всей настоящей заявке) относятся к аминокислотному остатку, находящемуся в положении 392 согласно нумерации Н3 из Winter et al. (1981). Следует отметить, что поскольку в полипептидах по настоящему изобретению часть домена НА1 (головной домен) была подвергнута делеции, нумерация, используемая в данном документе, не обязательно относится к фактическим положениям аминокислот в полипептидах стеблевого домена НА по настоящему изобретению. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что эквивалентные аминокислоты в других

штаммах и/или подтипах вируса гриппа, как, например, в HA H1, и в полипептидах стеблевого домена по настоящему изобретению могут быть определены с помощью выравнивания последовательностей (как показано, например, на фиг. 14).

"Полипептид" относится к полимеру из аминокислот, соединенных амидными связями, как известно специалистам в данной области. Данный термин, используемый в данном документе, может относиться к одной полипептидной цепи, соединенной с помощью ковалентных амидных связей. Данный термин может также относиться к нескольким полипептидным цепям, связанным с помощью нековалентных взаимодействий, таких как ионные контакты, водородные связи, ван-дер-ваальсовы контакты и гидрофобные контакты. Специалистам в данной области будет понятно, что данный термин включает полипептиды, которые были модифицированы, например, путем посттрансляционного процессинга, такого как отщепление сигнального пептида, образование дисульфидных связей, гликозилирование (например, N-связанное и O-связанное гликозилирование), расщепление протеазами и липидная модификация (например, S-пальмитоилирование).

"Полипептид стеблевого домена HA" относится к полипептиду, полученному из HA, который не содержит головной домена гемагглютинина (HA), встречающегося в природе (или дикого типа). Используемый в данном документе термин "дикий тип" относится к HA из вирусов гриппа, которые циркулируют в природе.

Подробное описание

Вирусы гриппа имеют значительное влияние на глобальное здравоохранение населения, вызывая миллионы случаев тяжелой болезни каждый год, тысячи смертей и значительные экономические потери. Существующие трехвалентные или четырехвалентные вакцины против гриппа вызывают сильный ответ с образованием нейтрализующих антител к вакцинным штаммам и близкородственным изолятам, который, однако, редко распространяется на более отличающиеся штаммы в пределах подтипа или на другие подтипы. В дополнение, выбор соответствующих вакцинных штаммов представляет много сложностей и часто приводит к недостаточной защите. Более того, прогнозирование подтипа следующего пандемического вируса, в том числе того, когда и где он появится, в настоящее время все еще невозможно.

Гемагглютинин (HA) является основным гликопротеином оболочки вирусов гриппа, который представляет собой основную мишень для нейтрализующих антител. Гемагглютинин имеет две главные функции в ходе процесса проникновения. Во-первых, гемагглютинин опосредует прикрепление вируса к поверхности клеток-мишеней благодаря взаимодействию с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту. Во-вторых, после эндоцитоза вируса гемагглютинин в дальнейшем инициирует слияние вирусной и эндосомальной мембран с высвобождением вирусного генома в цитоплазму клетки-мишени. HA содержит крупный эктодомен из ~500 аминокислот, который расщепляется ферментами хозяина с образованием 2 полипептидов (HA1 и HA2), остающихся соединенными дисульфидной связью. Большая часть N-концевого фрагмента (домена HA1, 320-330 аминокислот) образует мембранно-дистальный глобулярный "головной домен", который содержит рецепторсвязывающий участок и большинство детерминант, распознаваемых антителами, нейтрализующими вирус. Маленькая C-концевая часть (домен HA2, ~180 аминокислот) образует стеблевидную структуру, которая закорячивает глобулярный домен на клеточной или вирусной мембране. Степень идентичности последовательностей между подтипами является меньшей для полипептидов HA1 (34-59% идентичность между подтипами), чем для полипептидов HA2 (51-80% идентичность). Наиболее консервативная область представляет собой последовательность вблизи участка расщепления протеазой, в частности, 23 N-концевые аминокислоты HA2, которые являются консервативными среди всех подтипов вируса гриппа A (Logieau et al., 2010). Часть этой области доступна в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице HA (HA0), но становится недоступной после расщепления HA0 на HA1 и HA2.

Большинство нейтрализующих антител связываются с петлями, которые окружают рецепторсвязывающий участок, и тем самым препятствуют связыванию с рецептором и прикреплению. Так как эти петли являются высоковариабельными, большинство антител, нацеленных на эти области, являются штаммоспецифическими, что объясняет то, почему существующие вакцины вызывают выработку такого ограниченного штаммоспецифического иммунитета. Недавно, однако, были созданы полностью человеческие моноклональные антитела к гемагглютинину вируса гриппа с широким спектром перекрестно-нейтрализующей активности, такие как, например, CR6261. Функциональный и структурный анализ показал, что эти антитела препятствуют процессу слияния мембран и направлены на высококонсервативные эпитопы в стеблевом домене белка HA вируса гриппа группы 1 (Throsby et al., 2008; Ekiert et al. 2009, WO 2008/028946). После идентификации CR9114 (как описано в WO2013/007770), которое перекрестно реагирует со многими молекулами HA группы 1 и 2, стало ясно, что в иммунной системе человека можно вызвать выработку нейтрализующих антител очень широкого спектра действия к вирусам гриппа. Однако, с учетом необходимости в схеме ежегодной вакцинации, выработка этих антител после инфицирования или вакцинации (сезонными) вирусами гриппа подтипов H1 и/или H3, по-видимому, не вызывается или вызывается лишь в очень низкой степени.

В соответствии с настоящим изобретением представлены новые полипептиды стеблевого домена HA, которые имитируют специфические эпитопы для антитела CR6261 (содержащие вариабельную об-

ласть тяжелой цепи под SEQ ID NO: 11 и варибельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 12) и/или антитела CR9114 (содержащие варибельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 9 и варибельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 10). Полипептиды по настоящему изобретению можно использовать для выработки антител, нейтрализующих вирус гриппа, предпочтительно перекрестно нейтрализующих антител, при введении *in vivo* в отдельности либо в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения. Под "перекрестно нейтрализующими антителами" подразумевают антитела, которые способны нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 1, или по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 2, или по меньшей мере два различных подтипа вирусов гриппа В, или антитела, которые способны нейтрализовать по меньшей мере один вирус гриппа группы 1 и по меньшей мере один вирус гриппа группы 2 и/или по меньшей мере один вирус гриппа В.

Полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа, стабильно презентующие эпитопы для этих антител, ранее были описаны в WO 2013/079473. По меньшей мере некоторые из этих полипептидов стеблевого домена НА были способны стабильно презентировать эпитоп для CR6261 и/или CR9114 и, как показано, были иммуногенными у мышей. Дополнительные полипептиды стеблевого домена НА, способные стабильно презентировать эпитоп для CR6261 и/или CR9114, были описаны в WO 2014/191435, WO 2016/005480 и WO 2016/005482.

Полипептиды стеблевого домена НА по настоящему изобретению, содержащие новые модификации, демонстрируют повышенный уровень экспрессии в клетках млекопитающих, повышенную склонность к тримеризации (например, как измерено с помощью AlphaLISA) и/или повышенный уровень термостабильности (например, как измерено с помощью динамической сканирующей флуориметрии/калориметрии (DSF/DSC)) по сравнению с ранее описанными полипептидами стеблевого домена НА. Кроме того, аффинность всех тестируемых bnAb к полипептиду по настоящему изобретению составляет менее чем 1 нМ (измерено с помощью Octet и ELISA), что сходно с аффинностью антител к полноразмерному НА. Это четко указывает на то, что полипептиды имитируют стеблевой домен полноразмерного нативного НА. Кроме того, для новых полипептидов стеблевого домена НА не нужны никакие искусственные линкеры, метки и ни N-, ни C-концевые тримеризационные домены.

Таким образом, в настоящем изобретении представлены полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (НА) вируса гриппа А группы 1, содержащие домены НА1 и НА2, при этом указанные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, которая предусматривает, по сравнению с аминокислотной последовательностью полноразмерного полипептида НА (НА0), содержащего домены НА1 и НА2:

- (i) делецию головной области в домене НА1;
 - (ii) модификацию тримеризационной области в домене НА2, предпочтительно модификацию в С-спирали,
 - (iii) по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих внутримonomерный дисульфидный мостик;
 - (iv) по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих межмономерный дисульфидный мостик;
- где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392, представляет собой Р, R или Y, предпочтительно Р или R, и аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 434, представляет собой Q, и где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации Н3 согласно Winter et al. (1981).

Таким образом, в настоящем изобретении представлены полипептиды стеблевого домена НА (т.е. полипептиды НА без головного домена), содержащие:

- модификацию тримеризационной области в домене НА2, предпочтительно модификацию в С-спирали,
- по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих внутримonomерный дисульфидный мостик;
- по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих межмономерный дисульфидный мостик;
- где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392, представляет собой Р, R или Y, предпочтительно Р или R, и аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 434, представляет собой Q, и где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации Н3, используемой у Winter et al. (1981).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (НА) вируса гриппа А группы 1, содержащие домены НА1 и НА2, где указанные полипептиды стеблевого домена НА содержат аминокислотную последовательность, которая предусматривает, по сравнению с аминокислотной последовательностью полноразмерного полипептида НА (НА0), содержащего домены НА1 и НА2:

- (i) делецию головной области в домене НА1, при этом указанная делеция охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 53 до аминокислоты в положении 302 включительно;
- (ii) модификацию тримеризационной области в домене НА2, предпочтительно модификацию в тримеризационной области в С-спирали, при этом указанная область содержит аминокислотную последова-

тельность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 405, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 419, включительно;

(iii) цистеин в положении 310 и цистеин в положении 422;

(iv) цистеин в положении 397 в комбинации с цистеином в положении 405; или цистеин в положении 396 в комбинации с цистеином в положении 408; или цистеин в положении 399 в комбинации с цистеином в положении 405;

где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392, представляет собой Р, R или Y, предпочтительно Р или R, и где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 434, представляет собой Q; где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации H3 согласно Winter et al. (1981).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа А группы 1, предусматривающие:

(i) делецию головной области в домене HA1, при этом указанная делеция охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 53 до аминокислоты в положении 302 включительно;

(ii) модификацию тримеризационной области в домене HA2, предпочтительно модификацию в тримеризационной области в С-спирали, при этом указанная область содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 405 до аминокислоты в положении 419 включительно;

(iii) мутацию аминокислот в положениях 310 и 422 по типу замены на С;

(iv) мутацию аминокислоты в положении 397 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 405 по типу замены на С; или мутацию аминокислоты в положении 396 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 408 по типу замены на С; или мутацию аминокислоты в положении 399 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 405 по типу замены на С;

где полипептиды дополнительно содержат по меньшей мере одну мутацию в В-петле, при этом указанная В-петля содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 385 до аминокислоты в положении 404 включительно, где указанная по меньшей мере одна мутация в В-петле представляет собой мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на Р, R или Y, предпочтительно по типу замены на Р или R; и где полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q;

где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации H3, используемой у Winter et al. (1981).

В соответствии с настоящим изобретением было неожиданно обнаружено, что полипептиды стеблевого домена HA, имеющие аминокислотный остаток Y, Р или R, предпочтительно Р или R, в положении 392, например, благодаря введению в положение 392 в В-петле мутации аминокислоты по типу замены на Y, Р или R, предпочтительно по типу замены на Р или R; в комбинации с аминокислотным остатком Q в положении 434, например, благодаря введению в положение 434 мутации аминокислоты по типу замены на Q, продемонстрировали повышенные уровни экспрессии, повышенную склонность к тримеризации и/или повышенную стабильность по сравнению с ранее описанными полипептидами стеблевого домена HA. Кроме того, полипептиды стеблевого домена HA по настоящему изобретению способны индуцировать иммунный ответ на вирус гриппа.

Как известно специалистам в данной области, полноразмерный гемагглютинин (HA0) вируса гриппа, как правило, содержит домен HA1 и домен HA2. Стеблевой домен образован двумя сегментами домена HA1 и большей частью домена HA2 или им всем. Два сегмента домена HA1 отделены в первичной последовательности глобулярным головным доменом. Как описывается в данном документе, полипептиды стеблевого домена HA по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность, которая содержит несколько модификаций в домене HA1 и/или HA2 по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа полноразмерного полипептида HA (HA0), в частности, аминокислотной последовательностью HA группы 1.

Таким образом, по меньшей мере часть высоковариабельной и иммунодоминантной головной области в домене HA1 полипептида HA вируса гриппа, при этом указанная часть содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность, начинающуюся с аминокислоты в положении 53 и продолжающуюся до аминокислоты в положении 302 включительно, была подвергнута делеции из полноразмерного белка HA (HA0) с созданием полипептида стеблевого домена, также называемого "мини-HA" (фиг. 1А, вторая разработанная структура). Оставшиеся части домена HA1 соединены непосредственно либо с помощью линкера из 1-10 аминокислот. Таким образом, например, при делеции аминокислотной последовательности от аминокислоты в положении 53 до аминокислоты в положении 302 включительно аминокислота в положении 52 соединена с аминокислотой в положении 303 непосредственно либо благодаря замещению подвергнутой делеции головной области линкером из 1-10 аминокислот. Делеция аминокислотной последовательности от аминокислоты в положении 53 до аминокислоты в положении 302 включительно является минимальной делецией в домене HA1 (фиг. 1А, вторая разработанная структура). В соответствии с настоящим изобретением также может быть подвергнута делеции более крупная часть домена HA1, например, аминокислотная последовательность, начинающаяся с аминокислоты в

ность в домене HA2 от положения 405 до положения 419 была замещена гетерологичной тримеризационной последовательностью той же длины, т.е. с идентичным числом аминокислот.

В определенных вариантах осуществления гетерологичный тримеризационный домен представляет собой последовательность GCN4.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетерологичная тримеризационная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 18);
RIKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 19);
RMEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 20);
RIEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 21);
RMENLEKKVDDIEEK (SEQ ID NO: 22); и
RIENLEKKVDDIEEK (SEQ ID NO: 23).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из аминокислот гетерологичной тримеризационной последовательности была подвергнута мутации по типу замены на С, что обеспечивает образование межмономерного цистеинового мостика.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления гетерологичная тримеризационная последовательность содержит, таким образом, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 24);
CIKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 25);
CMEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 26);
CIEALEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 27);
RMECLEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 28); и
RIECLEKKVDDIEKK (SEQ ID NO: 29).

В предпочтительном варианте осуществления гетерологичная тримеризационная последовательность содержит аминокислотную последовательность CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 24).

В определенных вариантах осуществления модификация включает оптимизацию последовательности гептадного повтора в С-спирали, предпочтительно в тримеризационной области, содержащей аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 405 до аминокислоты в положении 419 включительно. Гептадный повтор, обозначаемый [abcdefg]_n, как правило, имеет гидрофобные остатки в а и d и полярные/заряженные остатки в е и g. Эти мотивы являются основой для большинства суперспиральных структур, которые представляют собой структурный мотив в белках, в котором альфа-спирали скручены друг с другом подобно нитям в канате (димеры и тримеры являются наиболее распространенными типами) (Ciani et al., 2010).

В качестве дополнительной модификации полипептиды стеблевого домена HA в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере два цистеиновых остатка, образующих (способных образовывать) внутримомерный цистеиновый (или дисульфидный) мостик. Сконструированный цистеиновый мостик может быть введен посредством мутации по меньшей мере одного остатка (если другой уже является цистеином), но обычно посредством мутации двух остатков, которые являются пространственно близкими друг к другу, по типу замены на цистеин, в результате чего самопроизвольно или посредством активного окисления образуется ковалентная связь между атомами серы в этих остатках. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат цистеин в положении 310 и цистеин в положении 422, что обеспечивает образование внутримомерного цистеинового мостика. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положениях 310 и 422 по типу замены на С, в результате чего образуется указанный внутримомерный цистеиновый мостик. Эти цистеиновые остатки, таким образом, образуют внутримомерный цистеиновый (или дисульфидный) мостик, который стабилизирует белок (см. фиг. 4).

Кроме того, для получения стабильных тримерных полипептидов стеблевого домена HA полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере два цистеиновых остатка, образующих межмономерный (межпротомерный) цистеиновый мостик. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат цистеин в положении 397 в комбинации с цистеином в положении 405; или цистеин в положении 396 в комбинации с цистеином в положении 408; или цистеин в положении 399 в комбинации с цистеином в положении 405.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 397 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 405 по типу замены на С; или мутацию аминокислоты в положении 396 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 408 по типу замены на С; или мутацию аминокислоты в положении 399 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 405 по типу замены на С, в результате чего образуется межмономерный цистеиновый мостик между цистеином в положении 397 первого мономера и цистеином в положении 405

второго мономера; или между цистеином в положении 396 первого мономера и цистеином в положении 408 второго мономера; или между цистеином в положении 399 первого мономера и цистеином в положении 405 второго мономера. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления аминокислоты в положениях 405 и 408 находятся в гетерологичной тримеризационной последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат цистеин в положении 397 и цистеин в положении 405, в результате чего образуется межмономерный цистеиновый мостик между цистеином в положении 397 первого мономера и аминокислотой в положении 405 второго мономера.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 397 по типу замены на цистеин и мутацию аминокислоты в положении 405 по типу замены на цистеин, в результате чего образуется межмономерный цистеиновый мостик между цистеином в положении 397 первого мономера и аминокислотой в положении 405 второго мономера.

Кроме того, в определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация была введена в так называемую В-петлю, при этом В-петля содержит аминокислотную последовательность, начинающуюся с аминокислоты в положении 385 и продолжающуюся до аминокислоты в положении 404 включительно (см. фиг. 1С). В соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере одна мутация представляет собой мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на Р, R или Y, предпочтительно по типу замены на R или P. Мутация по типу замены на R (заряженную аминокислоту) приводит к устраниванию исходной доступной гидрофобной аминокислоты (F в большинстве НА вируса гриппа) после удаления головного домена и повышению растворимости и экспрессии экспрессируемых полипептидов стеблевого домена. Мутация по типу замены на аминокислоту Р приводит к снижению склонности В-петли к образованию спирали. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в В-петле представляет собой мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на R. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в В-петле представляет собой мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на Р.

Кроме того, в определенных вариантах осуществления полипептидов по настоящему изобретению аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 395, представляет собой I, аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 399, представляет собой Y или C, предпочтительно Y, аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 400, представляет собой P, аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 401, представляет собой K, аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 402, представляет собой S, и/или аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 404, представляет собой R или Q (в этом случае также нумерация согласно нумерации НЗ). В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 392 представляет собой Р или R, аминокислота в положении 395 представляет собой I; аминокислота в положении 399 представляет собой Y; аминокислота в положении 402 представляет собой S; и аминокислота в положении 404 представляет собой R или Q.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды по сравнению с полипептидом НА дикого типа содержат, таким образом, по меньшей мере одну дополнительную мутацию в В-петле, выбранную из группы, состоящей из:

- мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 395, по типу замены на I;
- мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 399, по типу замены на Y или C, предпочтительно Y;
- мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 400, по типу замены на P;
- мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 401, по типу замены на K;
- мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 402, по типу замены на S и
- мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 404, по типу замены на Q или R.

В определенном варианте осуществления полипептиды по сравнению с полипептидом НА дикого типа содержат мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на Р или R, мутацию аминокислоты в положении 395 по типу замены на I; мутацию аминокислоты в положении 399 по типу замены на Y; мутацию аминокислоты в положении 402 по типу замены на S и необязательно мутацию аминокислоты в положении 404 по типу замены на Q или R.

В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 392 представляет собой Р или R, аминокислота в положении 395 представляет собой I; аминокислота в положении 399 представляет собой Y; аминокислота в положении 401 представляет собой K; аминокислота в положении 402 представляет собой S; и необязательно аминокислота в положении 404 представляет собой R или Q.

В другом предпочтительном варианте осуществления полипептиды по сравнению с полипептидом НА дикого типа содержат мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на Р или R, мутацию аминокислоты в положении 395 по типу замены на I; мутацию аминокислоты в положении 399 по типу замены на Y; мутацию аминокислоты в положении 401 по типу замены на K; мутацию аминокислоты в положении 402 по типу замены на S и необязательно мутацию аминокислоты в положении 404 по типу замены на R или Q.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат В-

петлю, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

IEKMNTQYTAIGKEYNKSER (SEQ ID NO: 126);
 IEKMNTQYTAIGCEYNKSER (SEQ ID NO: 127);
 IEKMNTQPTAIGCEYNKSEQ (SEQ ID NO: 128);
 IEKMNTQRTAIGCEFKNKSEQ (SEQ ID NO: 129);
 IEKMNTQPTAIGCEYNKSER (SEQ ID NO: 130);
 IEKMNTQPTAIGCEFKNKSEQ (SEQ ID NO: 131);
 IEKMNTQRTAIGCEYNKSER (SEQ ID NO: 132);
 IEKMNTQRTAICKEYPKSEQ (SEQ ID NO: 133); и
 IEKMNTQRTAIGKECNKSER (SEQ ID NO: 134).

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением аминокислота в положении 434 представляет собой Q. В определенных вариантах осуществления полипептиды стеблевого домена HA, таким образом, содержат мутацию аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q, которая приводит к улучшению их взаимодействий с образованием водородных связей. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 434 представляет собой Q, а аминокислота в положении 442 представляет собой A. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q и мутацию в положении 442 по типу замены на A. Эти мутации приводят к улучшению взаимодействия областей контакта тримеров в D- и E-спиралях, а также близлежащем фузионном пептиде и В₂В₃-петле.

Следует еще раз отметить, что используемая в данном документе нумерация аминокислотных положений основана на нумерации H3 согласно Winter et al. (1981). Также следует еще раз отметить, что нумерация аминокислотных положений, используемая в данном документе, основана на нумерации положений в полноразмерном полипептиде HA H3 (HA0). Таким образом, используемый в данном документе термин "аминокислота в положении 434" относится к аминокислоте в положении 434 в HA0 H3. Нумерация, таким образом, не относится к фактическим положениям аминокислот в полипептидах стеблевого домена HA по настоящему изобретению вследствие делеции головной области (см. фиг. 14).

Кроме того, в определенных вариантах осуществления аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 323, представляет собой K, и/или аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 326, представляет собой K. В предпочтительном варианте осуществления аминокислота в положении 323 представляет собой K, и аминокислота в положении 326 представляет собой K.

В определенных вариантах осуществления аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 339, представляет собой T.

В определенных вариантах осуществления аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 438, представляет собой E, и/или аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 442, представляет собой I.

В определенных вариантах осуществления полипептиды стеблевого домена HA, таким образом, дополнительно содержат одну или несколько дополнительных мутаций в домене HA1 и/или HA2 по сравнению с полипептидом HA дикого типа.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 323, по типу замены на K и/или мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 326, по типу замены на K. Эти мутации приводят к повышению растворимости и экспрессии молекулы. В другом варианте осуществления полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению содержат мутацию аминокислоты в положении 323 по типу замены на K и мутацию аминокислоты в положении 326 по типу замены на K.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 339, по типу замены на T. Эта мутация приводит к удалению доступной растворителю гидрофобной аминокислоты в петле фузионного пептида (петле FP) и повышению, таким образом, растворимости молекулы.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления аминокислота в положении 323 представляет собой K, аминокислота в положении 326 представляет собой K, аминокислота в положении 339 представляет собой T, аминокислота в положении 392 представляет собой Y, P или R, предпочтительно P или R, аминокислота в положении 395 представляет собой I, аминокислота в положении 399 представляет собой Y, аминокислота в положении 402 представляет собой S, аминокислота в положении 404 представляет собой Q или R, аминокислота в положении 434 представляет собой Q.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 323 по типу замены на K, мутацию аминокислоты в положении 326 по типу замены на K, мутацию аминокислоты в положении 339 по типу замены на T, мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на P или R, мутацию аминокислоты в положении 395 по типу замены на I, мутацию аминокислоты в положении 399 по типу замены на Y, мутацию аминокислоты в положении 402 по типу замены на S, мутацию аминокислоты в положении 404 по типу замены на Q или R и мута-

цию аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления аминокислота в положении 323 представляет собой K, аминокислота в положении 326 представляет собой K, аминокислота в положении 339 представляет собой T, аминокислота в положении 392 представляет собой P или R, аминокислота в положении 395 представляет собой I, аминокислота в положении 399 представляет собой Y, аминокислота в положении 402 представляет собой S, аминокислота в положении 404 представляет собой Q или R, аминокислота в положении 434 представляет собой Q, и аминокислота в положении 442 представляет собой A.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 323 по типу замены на K, мутацию аминокислоты в положении 326 по типу замены на K, мутацию аминокислоты в положении 339 по типу замены на T, мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на P или R, мутацию аминокислоты в положении 395 по типу замены на I, мутацию аминокислоты в положении 399 по типу замены на Y, мутацию аминокислоты в положении 402 по типу замены на S, мутацию аминокислоты в положении 404 по типу замены на Q или R, мутацию аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q и мутацию аминокислоты в положении 442 по типу замены на A.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 438, по типу замены на E в качестве возможной альтернативной отрицательно заряженной аминокислоты и мутации аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 442, по типу замены на I для повышения гидрофобности в области контакта тримеров.

В соответствии с настоящим изобретением полипептид стеблевого домена HA представляет собой полипептид HA группы 1. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением модификации, описываемые в данном документе, были введены в HA вируса гриппа из филогенетической группы 1, такого как вирус гриппа, содержащий HA подтипа H1, H2 или H5, с получением в результате полипептидов стеблевого домена HA по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления полипептид стеблевого домена представляет собой полипептид HA H1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептид стеблевого домена HA получен из HA вируса гриппа A, содержащего HA подтипа H1, как, например, из вируса гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или A/California/07/09 (H1N1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. Специалисту в данной области будет понятно, что полипептиды по настоящему изобретению также могут быть получены из HA других штаммов вируса гриппа A из группы 1, в том числе без ограничения A/Texas/UR06-0526/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 3), A/NewYork/629/1995 (H1N1) (SEQ ID NO: 4), A/AA/Marton/1943 (H1N1) (SEQ ID NO: 5), A/Puerto Rico/8/1934 (H1), A/Michigan/45/2015 (H1), A/Adachi/2/57 (H2N2) (SEQ ID NO: 6), A/Singapore/1/57 (H2N2) (SEQ ID NO: 7), или вирусов гриппа, содержащих HA подтипа H5, в том числе без ограничения A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (SEQ ID NO: 8) или A/Hong Kong/156/97 (H5).

Как описано выше, полипептиды стеблевого домена могут содержать или могут не содержать линкерную последовательность из 1-10 аминокислотных остатков, замещающую подвергнутую делеции последовательность HA1 и тем самым соединяющую две оставшиеся части HA1. В определенных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит 2, 3 или 4 аминокислоты. Линкерная последовательность может являться гетерологичной линкерной последовательностью, т.е. аминокислотной последовательностью, которая не встречается в HA, встречающемся в природе или дикого типа, такой как, без ограничения, G, GS, GGG, GSG, GSA, GSGS, GSAG, GGGG, GSAGS, GSGSG, GSAGSA, GSAGSAG и GSGSGSG.

В предпочтительных вариантах осуществления линкерная последовательность является гомологичной линкерной последовательностью, т.е. аминокислотной последовательностью, полученной из подвергнутой делеции соответствующей головной области, такой как, без ограничения, AGSG, AGS, GSG, HAGA, DQEG, DTPV, FPKT, EPGD, EPG, TGNL, TPSS, TPS, ATGN, YPGD.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды не содержат линкерную последовательность.

Как описано выше, расщепление белка HAO вируса гриппа (на HA1 и HA2) требуется для его активности, что облегчает проникновение вирусного генома в клетки-мишени, вызывая слияние эндосомальной мембраны хозяина с вирусной мембраной.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат природный участок расщепления протеазой. Таким образом, известно, что последовательность Arg (R) - Gly (G), охватывающая HA1 и HA2 (т.е. аминокислотные положения 329 и 330), представляет собой участок распознавания для трипсина и трипсиноподобных протеаз и, как правило, расщепляется для активации гемагглютинина (фиг. 1 A).

В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат участок расщепления протеазой. Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления участок расщепления

протеазой был удален посредством мутации аминокислотного остатка в положении 329 по типу замены на любую аминокислоту, отличную от аргинина (R) или лизина (K). В определенных вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 329 не является аргинином (R). В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат мутацию аминокислоты в положении 329 по типу замены на глутамин (Q). Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат нокаут-мутацию R329Q в участке расщепления для предотвращения предполагаемого расщепления молекулы в ходе получения *in vitro* или *in vivo* после введения.

В других вариантах осуществления полипептиды содержат многоосновный участок расщепления, например, участок расщепления фурином (как описывается в примере 6). Таким образом, полипептиды могут расщепляться фуриноподобными протеазами в клетке с получением расщепленного мини-НА аналогично нативно свернутому и процессированному НА.

В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность (иногда называемая сигнальным пептидом, нацеливающим сигналом, сигналом локализации, последовательностью локализации, транзитным пептидом, лидерной последовательностью или лидерным пептидом) представляет собой короткий пептид (обычно длиной 16-30 аминокислот), который присутствует на N-конце большинства новосинтезированных белков, которые предназначены для секреторного пути. Сигнальные последовательности функционируют, вызывая в клетке перемещение белка, обычно к клеточной мембране. Во многих случаях аминокислоты, составляющие сигнальный пептид, отщепляются от белка после достижения им его конечного места назначения. В НА вируса гриппа сигнальные последовательности обычно содержат первые 16 аминокислот аминокислотной последовательности полноразмерного НАО (соответствующие аминокислотам от положения -6 до положения 10 согласно нумерации НЗ).

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат сигнальную последовательность (часть сигнальной последовательности). Полипептиды могут содержать сигнальную последовательность дикого типа (часть сигнальной последовательности дикого типа) или могут содержать альтернативные сигнальные последовательности (часть альтернативных сигнальных последовательностей), такие как, без ограничения, сигнальная последовательность, выбранная из группы:

MGSTAILGLLLAVLQGVCA (SEQ ID NO: 136) и

MGMTSALLALLALALKPGAWA (SEQ ID NO: 137).

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат домен НА2, содержащий трансмембранный и цитоплазматический домены (соответствующий аминокислотной последовательности, начинающейся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 515, и продолжающейся до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 550, включительно (нумерация НЗ)).

Для получения секреторируемых (растворимых) полипептидов стеблевого домена в определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат трансмембранный и цитоплазматический домены. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат усеченный домен НА2, в частности, домен НА2, который является усеченным на С-конце. Усеченный домен НА2 в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, является более коротким, чем последовательность полноразмерного НА2, благодаря делеции одного или нескольких аминокислотных остатков на С-конце домена НА2.

В определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена НА2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 516, была подвергнута делеции с удалением тем самым по сути полных трансмембранного и цитоплазматического доменов.

В определенных вариантах осуществления также была подвергнута делеции часть С-концевой спирали. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что даже при делеции большей части домена НА2 могут быть получены стабильные растворимые полипептиды стеблевого домена НА. Таким образом, в определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена НА2, начинающаяся с аминокислотной последовательности в положении 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514 или 515, была подвергнута делеции (в этом случае также нумерация согласно нумерации НЗ, описанной у Winter et al., выше) с получением растворимого полипептида после экспрессии в клетках (фиг. 12).

В предпочтительном варианте осуществления С-концевая часть домена НА2 от положения, соответствующего 516, была подвергнута делеции.

Гетерологичная аминокислотная последовательность (т.е. аминокислотная последовательность, которая не встречается в природе в НА вируса гриппа) необязательно была соединена с (усеченным) доменом НА2.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления последовательности His-метки, например, ННННН (SEQ ID NO: 113) или ННННННН (SEQ ID NO: 114), или FLAG-метки (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 115) или их комбинация были соединены с С-концевой аминокислотой (необязательно усеченного) домена НА2 для целей выявления и/или очистки. В определенных вариантах осуществления гетерологичная аминокислотная последовательность, такая как последовательность His-метки, может

быть присоединена к (усеченному) домену HA2 с помощью линкера. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать участок протеолитического расщепления (часть участка протеолитического расщепления), например, аминокислотную последовательность IEGR (SEQ ID NO: 116) или LVPRGS (SEQ ID NO: 117), для ферментативного удаления последовательности His-метки после очистки.

В определенных вариантах осуществления гетерологичная аминокислотная последовательность, соединенная с С-концевой аминокислотой (усеченного) домена HA2, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

GYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL (фолдон) (SEQ ID NO: 118),

SGRDYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFLGHHHHH

H (FLAG - фолдон - His-метка) (SEQ ID NO: 119),

SGRDYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHH

HH (FLAG - линкер GS - His-метка) (SEQ ID NO: 120),

EGRAAAGGSGGGGSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGV
SVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVPIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLV
IDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVT
GWRLCERILAAAASHPQFEKGAAWHPQFEKGAAWHPQFEK (NanoLuc - Strep-
метка) (SEQ ID NO: 121),

EGRAAAGGSGGGGSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGV
SVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVPIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLV
IDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVT
GWRLCERILAGAAEPEA (NanoLuc - C-метка) (SEQ ID NO: 122),

EGRAAAWHPQFEKGAAWHPQFEKGAAWHPQFEK (Strep-метка, SEQ ID NO:
154),

EGRAAALPETGGGAAEPEA (сортаза - C-метка) (SEQ ID NO: 123),

SGRDYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWHPQ
FEKGAAWHPQFEKGAAWHPQFEK (FLAG - линкер GS - Strep-метка) (SEQ ID NO:
124) и

EGRAAAEQKLISEEDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSW
HPQFEKGAAWHPQFEKGAAWHPQFEK (Myc-метка - линкер GS - Strep-метка) (SEQ
ID NO: 125).

В определенных вариантах осуществления гетерологичный тримеризационный домен был соединен с С-концевой аминокислотой (необязательно усеченного) домена HA2, такой как, без ограничения, тримеризационный домен "фолдон" (как описано у Letarov et al. (1993); S-Guthe et al. (2004)).

В определенных вариантах осуществления полипептиды стеблевого домена HA содержат аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 30;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 31;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 52;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 53;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 54;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 55;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 56;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 57;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 58;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-237 из SEQ ID NO: 59;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 60;

аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 1-234 из SEQ ID NO: 61;

В определенных вариантах осуществления полипептиды гликозилируются при экспрессии в подходящих клетках (например, клетках млекопитающих). Полипептиды могут содержать один или несколько нативных мотивов гликозилирования. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере один дополнительный/введенный мотив гликозилирования. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один мотив гликозилирования был введен посредством мутации аминокислоты в положении 402 по типу замены на S. В результате этой мутации будет вводиться мотив N-связанного гликозилирования в положение 400.

Полипептиды также можно вводить в комбинации с наночастицами или конъюгированными с наночастицами, такими как, например, полимеры, липосомы, виросомы, вирусоподобные частицы. Полипептиды могут быть объединены с наночастицами, инкапсулированы в них или конъюгированы с ними (например, ковалентно связаны с ними или адсорбированы на них).

Кроме того, в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа по настоящему изобретению. Специалисту в данной области понятно, что несколько различных молекул нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же полипептид по причине вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут с помощью стандартных методик осуществлять нуклеотидные замены, которые не влияют на полипептидную последовательность, кодируемую описанными полинуклеотидами, для отражения частоты использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды должны экспрессироваться. Следовательно, если не указано иное, то выражение "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды стеблевого домена HA вируса гриппа, являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, таких как клетки человека. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378).

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид стеблевого домена HA вируса гриппа, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 138-145.

Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа можно получить согласно любой методике, которая считается подходящей для специалиста в данной области, включая методики, описанные ниже. Таким образом, полипептиды по настоящему изобретению можно синтезировать в виде последовательностей ДНК с помощью стандартных способов, известных из уровня техники, и клонировать, а затем экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с помощью подходящих ферментов рестрикции и способов, известных из уровня техники.

Кроме того, настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, является частью вектора, например, плазмиды. С такими векторами можно легко производить манипуляции с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и их, например, разрабатывают так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Используемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно использовать для обеспечения транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. При использовании клеток-хозяев предпочтительно, чтобы вектор представлял собой интегрирующий вектор. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой эписомально реплицирующийся вектор. Специалист в данной области способен выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функциональным образом. Специалистам в данной области хорошо известно, что для достижения экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, последовательности, способные управлять экспрессией, можно функционально связать с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид, с получением рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок или полипептид в экспрессируемом формате. Последовательности, управляющие экспрессией, могут включать в себя промоторы, энхансеры и т.п., а также их комбинации. Они должны быть способными функционировать в клетке-хозяине, тем самым управляя экспрессией последовательностей нуклеиновой кислоты, которые функционально связаны с ними. Специалист в данной области осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получить из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или разработать искусственным путем. Экспрессия нуклеиновых кислот, представляющих интерес, может происходить под управлением природного промотора или его производного или под управлением полностью гетерологичного промотора (Kaufman, 2000). Некоторые хорошо известные и наиболее часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовируса, например,

промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как немедленно-ранний (IE) промотор CMV (называемый в данном документе промотором CMV) (получаемый, например, из pcDNA, Invitrogen), промоторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40) (Das et al, 1985), и т.п. Из эукариотических клеток также можно получить подходящие промоторы, такие как промоторы генов металлотронеинов (MT), промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1 α) (Gill et al., 2001), промотор гена убиквитина C или UB6 (Gill et al., 2001), промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов белков теплового шока и т.п. Тестирование промоторной функции и силы промотора является стандартной практикой для специалиста в данной области и, как правило, может, например, охватывать клонирование тестируемого гена, такого как ген lacZ, люциферазы, GFP и т.д., позади промоторной последовательности и тестирование экспрессии тестируемого гена. Разумеется, промоторы можно изменять посредством делеции, добавления, мутации последовательностей в них и тестировать в отношении функциональности для обнаружения новых, ослабленных или улучшенных, промоторных последовательностей. В соответствии с настоящим изобретением сильные промоторы, которые обеспечивают высокие уровни транскрипции в выбранных эукариотических клетках, являются предпочтительными.

Конструкции можно вводить путем трансфекции в эукариотические клетки (например, клетки растений, грибов, дрожжей или животных) или подходящие прокариотические системы экспрессии, такие как *E. coli*, с помощью способов, которые хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых случаях подходящую последовательность "метки" (такой как, например, без ограничения, His-, Мус-, Strep-метка, сортаза или FLAG-метка) или полного белка (такого как, например, без ограничения, мальтозосвязывающий белок или глутатион-S-трансфераза) можно добавлять к последовательностям по настоящему изобретению, описанным выше, для обеспечения очистки и/или идентификации полипептидов из клеток или надосадочной жидкости. Необязательно можно включить последовательность, содержащую специфический участок протеолиза, для последующего удаления метки путем протеолитического расщепления.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды вырабатываются в клетках млекопитающих.

Очищенные полипептиды можно анализировать с помощью спектроскопических способов, известных из уровня техники (например, спектроскопии кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и ЯМР-спектроскопии или рентгеновской кристаллографии), для исследования наличия необходимых структур, таких как спирали и бета-складчатые слои. ELISA, AlphaLISA, биослойную интерферометрию (Octet) и FACS и т.п. можно применять для исследования связывания полипептидов по настоящему изобретению с нейтрализующими антителами широкого спектра действия, такими как CR6261 и/или CR9114. Таким образом, можно выбрать полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, имеющие нужную конформацию. Содержание тримеров можно анализировать, например, с помощью электрофореза в геле с SDS в невосстанавливающих условиях, эксклюзионной хроматографии в присутствии Fab-фрагментов антител из нейтрализующих антител широкого спектра действия, таких как CR6261 и/или CR9114, а также AlphaLISA с использованием различным образом меченных антител. Стабильность полипептидов можно оценить, как описано выше, после температурного стресса, циклов замораживания-размораживания, повышения концентрации белка или взбалтывания. Температуру плавления полипептида можно дополнительно оценить с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) и/или дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека. Таким образом, в настоящем изобретении также представлены рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид стеблевого домена HA в соответствии с настоящим изобретением. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид стеблевого домена, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 и SEQ ID NO: 145.

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе по отношению к аденовирусу, подразумевает, что он был модифицирован человеком, например, он имеет измененные концевые участки, активно клонированные в него, и/или он содержит гетерологичный ген, т.е. он не является встречающимся в природе аденовирусом дикого типа. В определенных вариантах осуществления в аденовирусном векторе в соответствии с настоящим изобретением имеет место дефицит по меньшей мере одного существенно важного функционального гена области E1, например, области E1a и/или области E1b, аденовирусного генома, который требуется для репликации вируса. В определенных вариантах осуществления в аденовирусном векторе в соответствии с настоящим изобретением имеет место дефицит по меньшей мере части области E3, не являющейся существенно важной. В определенных вариантах осуществления в векторе имеет место дефицит по меньшей мере одного существенно важного функционального гена области E1 и по меньшей мере части области E3, не являющейся существенно важной. В аденовирусном векторе может иметь место "множественный дефицит", что означает, что в данном аденовирусном векторе имеет место дефицит одного или нескольких существенно важных функциональных генов в каждой из двух или бо-

лее областей аденовирусного генома. Например, в вышеупомянутых аденовирусных векторах с дефицитом E1 или с дефицитом E1 и E3 может дополнительно иметь место дефицит по меньшей мере одного существенно важного гена области E4 и/или по меньшей мере одного существенно важного гена области E2 (например, области E2A и/или области E2B). Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913.

В определенных вариантах осуществления аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26 или 35.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением, а также фармацевтически приемлемый носитель. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество полипептидов, нуклеиновых кислот и/или векторов по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции, кроме того, содержат фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель в используемых дозах и концентрациях не будет вызывать нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым его вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Термин "носитель" относится к разбавителю, наполнителю или среде, с которыми вводят полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или векторы. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина можно, например, использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов.

Кроме того, настоящее изобретение относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описываемым в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата.

В частности, настоящее изобретение относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описываемым в данном документе, для применения в индукции иммунного ответа на вирус гриппа.

Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа на вирус гриппа А у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение указанному субъекту полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описанных выше. Субъект в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является млекопитающим, которое может инфицироваться вирусом гриппа или может иным образом получить пользу от индукции иммунного ответа, при этом такой субъект, например, является грызуном, например, мышью, хорьком, или домашним или сельскохозяйственным животным, или приматом, отличным от человека, или человеком. Субъект предпочтительно является субъектом-человеком.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индукции иммунного ответа на вирус гриппа А группы 1. Иммунный ответ может включать в себя гуморальный (т.е. индукцию выработки антител, нейтрализующих вирус гриппа) и/или клеточный иммунный ответ. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индукции иммунного ответа на по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть подтипов вирусов гриппа А. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индукции иммунного ответа на вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н1.

В определенных вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ является эффективным для предупреждения и/или лечения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой вирусом гриппа А группы 1, таким как вирус гриппа А, содержащий НА подтипа Н1, и/или вирус гриппа А, содержащий НА подтипа Н2, и/или вирус гриппа А, содержащий НА подтипа Н5. В некоторых вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ является эффективным для предупреждения и/или лечения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, содержащим НА подтипа Н1.

Кроме того, настоящее изобретение относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описываемым в данном документе, для применения в качестве вакцины против гриппа.

В определенных вариантах осуществления полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы по настоящему изобретению вводят в комбинации с адъювантом. Адъювант можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения полипептидов, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции в виде масляной эмульсии (или композиции типа "масло в воде"), в том числе эмульсии сквалена в воде, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы на основе сапонины, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184; WO 96/11711; WO 2004/004762; WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорилипид А (MPL), 3-О-деацелированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилированные бактериальные токсины или их мутантные формы, такие как термолабильный

энтеротоксин LT E. coli, холерный токсин СТ, коклюшный токсин РТ или столбнячный анатоксин ТТ, Matrix М или их комбинации. В дополнение, можно применять известные иммуностимулирующие технологии, такие как слияние полипептидов по настоящему изобретению с белками, известными из уровня техники как усиливающие иммунный ответ (например, со столбнячным анатоксином, CRM197, rCTB, бактериальными флагеллинами или другими), или включение полипептидов в виросомы, или их комбинации.

Введение полипептидов, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов согласно настоящему изобретению можно выполнять с помощью стандартных путей введения. Неограничивающие примеры включают в себя парентеральное введение, такое как внутривенное, внутрикожное, чрескожное, внутримышечное, подкожное и т.д., или введение через слизистую оболочку, например, интраназальное, пероральное и т.п. Специалист в данной области будет способен определить различные возможности для введения полипептидов, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением с целью индукции иммунного ответа.

В определенных вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор вводят более чем один раз, т.е. согласно так называемой гомологичной схеме "примирование-стимулирование". Введение второй дозы можно выполнять, например, через одну неделю после введения первой дозы, через две недели после введения первой дозы, через три недели после введения первой дозы, через один месяц после введения первой дозы, через шесть недель после введения первой дозы, через два месяца после введения первой дозы, через 3 месяца после введения первой дозы или через 4 месяца или больше после введения первой дозы и т.д., вплоть до нескольких лет после введения первой дозы полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора по настоящему изобретению. Также можно вводить полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы более двух раз, например, три раза, четыре раза и т.д., так, чтобы за первым примирующим введением следовало более чем одно стимулирующее введение.

Полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы можно также вводить в качестве примирующей либо в качестве стимулирующей вакцинации согласно гетерологичной схеме "примирование-стимулирование".

Кроме того, в настоящем изобретении представлены способы предупреждения и/или лечения, предпочтительно предупреждения, заболевания, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описываемых в данном документе. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, нуклеиновой кислоты и/или вектора, которое является эффективным для предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания или состояния, обусловленного инфицированием вирусом гриппа. Предупреждение охватывает ингибирование или снижение распространения вируса гриппа или ингибирование или ослабление начала проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфицированием вирусом гриппа. Выражение "облегчение", используемое в данном документе, может относиться к ослаблению видимых или ощутимых симптомов заболевания, вирусии или любых других поддающихся измерению проявлений инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Субъект, нуждающийся в лечении, включает субъектов, у которых уже имеется состояние, обусловленное инфицированием вирусом гриппа, а также тех, у которых необходимо предупредить инфицирование вирусом гриппа. Полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или векторы по настоящему изобретению, таким образом, можно вводить субъекту, ранее не получавшему лечение, т.е. субъекту, у которого отсутствует заболевание, вызванное гриппозной вирусной инфекцией, или который не был инфицирован и в настоящее время не инфицирован гриппозной вирусной инфекцией, или субъектам, которые уже были инфицированы вирусом гриппа.

В одном варианте осуществления предупреждение и/или лечение может быть нацелено на группы пациентов, которые являются восприимчивыми к гриппозной вирусной инфекции. Такие группы пациентов включают без ограничения, например, пожилых (например, в возрасте ≥ 50 лет, в возрасте ≥ 60 лет и предпочтительно в возрасте ≥ 65 лет), молодых (например, в возрасте ≤ 5 лет, в возрасте ≤ 1 года), госпитализированных пациентов, субъектов с ослабленным иммунитетом и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но у которых наблюдался неудовлетворительный противовирусный ответ.

Полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы по настоящему изобретению можно вводить субъекту в комбинации с одним или несколькими другими активными средствами, такими как альтернативные вакцины против гриппа, моноклональные антитела, противовирусные средства, антибактериальные средства и/или иммуномодулирующие средства. Одно или несколько других активных средств могут быть полезными в лечении и/или предупреждении заболевания, вызываемого вирусом гриппа, или могут облегчать симптом или состояние, ассоциированное с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других активных средств представляют собой обезболивающие средства, жаропонижающие лекарственные препараты или тера-

пептические средства, которые облегчают дыхание или способствуют ему.

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

Примеры

Пример 1. Получение полипептидов на основе стеблевого домена по настоящему изобретению.

В WO 2013/079473 описаны первая серия полипептидов стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, композиции и вакцины на их основе и способы их применения в предупреждении и/или лечении гриппа, в том числе полипептиды Н1-мини2-кластер1+5+6-GCN, как в виде мембраносвязанной формы (с природным трансмембранным доменом, SEQ ID NO: 45 в WO2013/079473), так и в виде их растворимой формы s-Н1-мини2-кластер1+5+6-GCN4 (без природного трансмембранного домена, SEQ ID NO: 145 в WO 2013/079473).

В WO 2014/191435 описаны дополнительные полипептиды стеблевого домена, полученные из полноразмерного НА Н1N1 A/Brisbane/59/2007, которые содержали дополнительные мутации по сравнению с Н1-мини2-кластер1+5+6-GCN4, а также стабильно презентировали эпитоп для нейтрализующего антигена широкого спектра действия CR6261 и/или CR9114.

Все эти полипептиды стеблевого домена были созданы посредством делеции головного домена из НА1, в частности, области, содержащей аминокислоты, начиная от положения 46 и до аминокислоты в положении 306 включительно, и замещения подвергнутой делеции области линкером, как описано в WO 2013/079473. Следует отметить, что в WO 2013/079473 нумерация аминокислотных положений была основана на нумерации полноразмерного НА вируса гриппа A/Brisbane/59/2007 (т.е. SEQ ID NO: 1 в WO 2013/079473), тогда как в настоящем изобретении используется нумерация Н3 по Winter et al.

При удалении головного домена часть молекулы, которая была ранее защищена от водного растворителя, остается доступной для него, что тем самым дестабилизирует структуру полипептидов по настоящему изобретению. По этой причине один или несколько аминокислотных остатков в В-петле, т.е. области, содержащей аминокислоты 385-404 (фиг. 1С), подвергали мутации для стабилизации полипептидов. Подобным образом, в зоне около фузионного пептида ряд гидрофобных остатков является доступным для растворителя, что обусловлено тем фактом, что, в отличие от нативного полноразмерного НА, полипептиды не могут расщепляться и подвергаются соответствующему конформационному изменению, при котором гидрофобный фузионный пептид погружается во внутреннюю часть белка. Чтобы решить эту проблему, некоторые или все гидрофобные аминокислотные остатки в положении 323, 326 и 339 подвергали мутации по типу замены на гидрофильные остатки по сравнению с полноразмерным НА дикого типа из A/Brisbane/59/2007.

Кроме того, полипептиды были устойчивыми к расщеплению протеазами благодаря мутации природного участка расщепления, например, благодаря мутации аминокислоты в положении 329 по типу замены на Q.

В WO 2016/005480 описана следующая серия полипептидов стеблевого домена, в которых полученная из GCN4 последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 18) была введена в положения 405-419, таких как, например, полипептиды, обозначенные как 127Н1-t2, s127Н1-t2 и s127Н1-12-длинный, полученные из A/Brisbane/59/2007. Кроме того, были получены полипептиды стеблевого домена с теми же модификациями с использованием НА из различных штаммов вируса гриппа, например, полипептиды на основе НА, полученные из Н1N1 штамма A/California/07/09, такие как smН1 Cali3964-127Н1-t2 и mН1 Cali3964-127Н1-t2.

В WO 2016/005482 описано введение межмономерного цистеинового мостика, что приводит в результате к увеличению количества тримерных полипептидов стеблевого домена, в том числе полипептидов, обозначенных как 127Н1-t2-c118 (также называемый 5367) и растворимый вариант 127Н-t2-c118-длинный, в основе которых лежал НА вируса гриппа A/Brisbane/59/2007. Сходные полипептиды были разработаны на основе, например, НА вируса гриппа A/California/07/09, например, полипептиды, обозначенные как mН1 Cali3964-127Н1-t2-c118 (также называемый 5369) и smН1 Cali3964-127Н1-t2-c118-длинный. Эти полипептиды стеблевого домена предусматривали, помимо прочего, делецию головной области, содержащей аминокислоты, начиная от положения 46 и до аминокислоты в положении 306 включительно, при этом полученные домены НА1 были соединены с помощью линкера из 4 аминокислот (GGGG); полученную из GCN4 последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 18), введенную в домен НА2 в положения 405-419; и мутацию аминокислоты в положении 329 по типу замены на Q с получением полипептида, устойчивого к расщеплению протеазами. Полипептиды, кроме того, содержали мутацию аминокислоты в положении 397 по типу замены на С и мутацию аминокислоты в положении 405 по типу замены на С (т.е. первой аминокислоты в последовательности GCN4), за счет чего обеспечивалось образование межмономерного цистеинового мостика между цистеином в положении 397 первого мономера и аминокислотой в положении 405 второго мономера.

В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, ранее описанные полипептиды стеблевого домена были оптимизированы. Аминокислотные последовательности НА дикого типа, полученного из A/Brisbane/59/2007 и/или A/California/07/09, представляют собой последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно. Полипептиды UFV5367 (SEQ ID NO: 16) и UFV5369 (SEQ ID NO: 17) называ-

ются в данном документе "исходными штаммами/конструкциями" (схематически показаны на фиг. 2 и 3 соответственно).

Таким образом, были разработаны новые полипептиды стеблевого домена HA, в том числе, например, UFV150558 (SEQ ID NO: 30) и UFV150850 (SEQ ID NO: 53), которые содержат дополнительные модификации по сравнению с ранее описанными полипептидами стеблевого домена UFV5367 (SEQ ID NO: 16) и UFV5369 (SEQ ID NO: 17). В частности, полипептиды UFV150558 и UFV150850 содержат мутацию аминокислоты в положении 392 в В-петле по типу замены на Р или R в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q или мутацию аминокислоты в положении 392 в В-петле по типу замены на Р или R в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q и мутацией в положении 442 по типу замены на А.

Кроме того, были разработаны дополнительные полипептиды стеблевого домена, в которых не использовался искусственный линкер для замещения подвергнутой делеции головной области. Полипептиды стеблевого домена UFV160655 (SEQ ID NO: 103), UFV160656 (SEQ ID NO: 104), UFV160664 (SEQ ID NO: 109) и UFV160665 (SEQ ID NO: 110) предусматривали делецию головной области от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно, в результате которой, таким образом, оставалась первая часть домена HA1, содержащая аминокислоты до аминокислоты 46 включительно, и вторая часть домена HA1, содержащая аминокислоты, начиная с аминокислоты в положении 307 и до С-концевой аминокислоты домена HA1 (т.е. аминокислоты в положении 329). Первая часть HA1 была непосредственно соединена со второй частью HA1 после делеции головной области, т.е. оставшаяся аминокислота в положении 46 (С-концевая аминокислота первой части домена HA1) была непосредственно присоединена к оставшейся аминокислоте в положении 307 (N-концевой аминокислоте второй части домена HA1). Искусственный линкер не вводили (см. фиг. 1 А, нижняя конструкция). Пептиды также содержали дополнительные мутации аминокислоты в положении 392 в В-петле по типу замены на Р или R в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q или в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q и мутацией в положении 442 по типу замены на А (как схематически показано на фиг. 4).

Пример 2. Экспрессия полипептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды UFV150558, UFV150850, UFV160655, UFV160656, UFV160664 и UFV160665 по настоящему изобретению, синтезировали (GenScript) и клонировали в плазмиду pcDNA2004 (внутрилабораторно модифицированный вектор pcDNA3 с усиленным промотором CMV). Полипептиды получали в клетках HEK293F, культивируемых в среде Freestyle™, путем транзientной трансфекции полученных экспрессионных плазмид с помощью реагента для трансфекции 293fectin™ (Invitrogen). Полипептиды получали в культурах клеток ExpiCHO в экспрессионной среде ExpiCHO™ путем транзientной трансфекции с помощью реагента для трансфекции ExpiFectamine™ (Gibco, ThermoFisher Scientific). Для культивирования клеток ExpiCHO добавляли усилитель трансфекции ExpiFectamine CHO и подпитку ExpiCHO (Gibco, ThermoFisher Scientific) через 1 день после трансфекции. Образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие секретируемые полипептиды, собирали в дни 7-11 (для клеток ExpiCHO) путем центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтронасадку на бутылку с размером пор 0,2 мкм (Corning).

Анализ надосадочной жидкости культуры.

Уровень экспрессированного полипептида в собранной надосадочной жидкости культуры оценивали с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы OCTET. Вкратце, биотинилированное mAb CR9114 иммобилизовали на биосенсорах, покрытых стрептавидином (SA) (Pall FortéBio), после чего строили калибровочную кривую путем оценивания сдвига связывания серии разведений хорошо описанного очищенного гомологичного полипептида. Затем измеряли сдвиг связывания предварительно разбавленных собранных образцов надосадочной жидкости культуры, содержащих полипептиды по настоящему изобретению (5-15 мкг/мл, разбавленные в буфере для кинетического анализа), и концентрацию полипептидов рассчитывали с помощью построенной калибровочной кривой.

Содержание тримеров полипептидов в образцах надосадочной жидкости культуры оценивали с помощью AlphaLISA посредством одновременного связывания 1,5 нМ CR9114 и 1,5 нМ меченного Strep-Tactin однодоменного антитела (SD15016), имеющего последовательность под SEQ ID NO: 13. Хемилюминесцентное испускание при 615 нм измеряли после 2-часового инкубирования полипептидов с антителом и однодоменным антителом при комнатной температуре в присутствии акцепторных гранул, покрытых антителом к IgG человека, и донорных гранул, покрытых Strep-Tactin (Perkin Elmer). Только тримерные молекулы, в которых было представлено более одного правильно свернутого эпитопа, связывались обоими антителами одновременно и, таким образом, давали сигнал в этом анализе (в отличие от мономеров и потенциальных агрегатов). Полипептиды титровали, исходя из концентрации белка, оцениваемой с помощью OCTET.

Результаты и выводы.

Уровни экспрессии полипептидов и содержание тримеров определяли для трех независимых транс-

фекционных сред ExpiCHO объемом 70 мл в день 9 после трансфекции. Результаты показаны на фиг. 5. По сравнению с ранее описанной конструкцией 5367 (SEQ ID NO: 16) (которая предусматривает делецию в домене HA1, охватывающую аминокислоты, начиная от положения 46 и до аминокислоты в положении 306 включительно, и содержит линкер 4G, замещающий подвергнутую делеции часть в домене HA1), также называемой исходной разработанной структурой/конструкцией, полипептид UFV160655 на основе H1N1 A/Brisbane/07/59 (который предусматривает делецию в домене HA1, охватывающую аминокислоты, начиная от положения 47 и до аминокислоты в положении 306 включительно, и не содержит линкер 4G, замещающий подвергнутую делеции часть в домене HA1, и содержит точечные мутации Y392P, R404Q, E434Q и S442A) (SEQ ID NO: 103) четко демонстрировал повышенные уровни экспрессии (до 40-кратных), достигая концентрации ~500 мг/л надосадочной жидкости культуры (фиг. 5A).

Полученный из H1N1 A/California/07/09 исходный полипептид UFV5369 (SEQ ID NO: 17) экспрессировался на уровне ~350 мг/л надосадочной жидкости культуры. Полипептид UFV150558, сходный по конструкции с полипептидом UFV5369 и дополнительно содержащий точечные мутации Y392P, R404Q, E434Q и S442A (SEQ ID NO: 30), экспрессировался на уровне ~427 мг/л. Полипептиды UFV160656 (SEQ ID NO: 104) (предусматривающий делецию, охватывающую аминокислоты от положения 47 до аминокислоты в положении 306 включительно и не содержащий линкер 4G, замещающий подвергнутую делеции часть в домене HA1, а также содержащий точечные мутации Y392P, R404Q, E434Q и S442A), UFV160664 (предусматривающий такую же делецию, но содержащий только точечные мутации Y392R и E434Q) (SEQ ID NO: 109) и UFV160665 (предусматривающий такую же делецию и содержащий точечные мутации Y392P и E434Q) (SEQ ID NO: 110) экспрессировались на более высоком уровне по сравнению с 5369, составляющем до ~800 мг/л надосадочной жидкости культуры (фиг. 5A).

Что касается содержания тримеров, все полипептиды, содержащие одну или несколько дополнительных новых мутаций, независимо как от их остова, штамма, размера делеции головного домена, так и присутствия или отсутствия линкера 4G, замещающего подвергнутую делеции часть домена HA1, достигали уровней выше 90%, что значительно превышало уровни, которые достигались для исходных разработанных структур, в случае с которыми только ~25% экспрессируемого белка успешно образовывало тримеры (фиг. 5B).

Были получены дополнительные полипептиды, содержащие мутацию аминокислоты в положении 392 по типу замены на Y, P или R в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 434 по типу замены на Q, в том числе UFV160302 (SEQ ID NO: 60) и UFV160303 (SEQ ID NO: 61). Полипептид UFV160304 (SEQ ID NO: 62), который имеет конструкцию, сходную с полипептидом UFV160302, но не содержит точечную мутацию Y392R, демонстрировал более низкое содержание тримеров (в ~1,7 раза) (фиг. 5C).

В совокупности полипептиды по настоящему изобретению, описываемые в этом примере, содержащие Y, P или R в положении 392 в комбинации с Q в положении 434, демонстрировали значительно повышенные уровни экспрессии белка и содержание тримеров (процентное количество успешно образованных тримеров) по сравнению с исходными разработанными структурами. Присутствие этих аминокислот в положениях 392 и 434 приводило к значительному улучшению экспрессии, тримеризации и стабильности.

Пример 3. Очистка тримерных полипептидов по настоящему изобретению.

Выделение.

Полипептиды очищали посредством двухстадийного протокола. Вначале собранную и осветленную надосадочную жидкость культуры загружали в колонку Hi Scale 16/20 (GE Healthcare), упакованную аффинной смолой (Capture Select), которая состоит из однодоменного антитела, специфичного к HA, иммобилизованного на гранулах Poros (полученных от ThermoFisher Scientific). Эта смола является высокоспецифичной в отношении белков гемагглютининов, полученных из штамма H1. Колонку намеренно перегружали на ~15% для улучшения выделения тримера. После связывания и уравнивания в 50 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4, полипептиды элюировали путем применения ступенчатого градиента до 0,1 M Tris, 2 M MgCl₂, 40% пропиленгликоля, pH 7,4. На основании UV-сигнала (A280) элюированные фракции объединяли и фильтровали через фильтровальную мембрану Millex-GV с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore). Затем собранный пик элюирования вносили в колонку Superdex 26/60 200 pg (GE Healthcare), уравниваемую подвижным буфером (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8), с целью доочистки, т.е. для удаления минимального количества мультимерного и мономерного белка. Фракции тримеров объединяли, и чистоту оценивали с помощью аналитического SEC-MALS на установке для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) серии Infinity 1260 (Agilent). 40 мкг каждого очищенного полипептида прогоняли (1 мл/мин.) через колонку TSKgel G3000SWxl (Sigma-Aldrich), и молярную массу элюированного материала измеряли с помощью детектора многоугольного рассеяния света miniDAWN Treos и дифференциального рефрактометра Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Данные анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6, а расчеты молекулярной массы производили, исходя из сигнала показателя преломления.

Результаты и выводы.

Профиль элюирования на второй стадии очистки (эксклюзионной хроматографии) указывал на то,

что в объединенных элюированных фракциях из колонки для аффинной хроматографии присутствовало большое количество нетримерного (агрегаты и мономер) полипептида 5367. В отличие от этого, хроматограмма UFV160656 демонстрировала лишь небольшое количество агрегатов, тогда как основным присутствующим соединением был тримерный полипептид (фиг. 6А и В).

Выход исходных конструкций UFV5367 и UFV5369 составлял 5 и 70 мг/л соответственно, тогда как выходы для полипептидов по настоящему изобретению варьировались от 120 до 240 мг/л. Процент извлечения, рассчитанный путем сравнения количества белка, присутствующего в надосадочной жидкости культуры и тримерном конечном продукте, составлял примерно 40-60%. Анализ объединенных фракций тримеров с помощью аналитического SEC-MALS продемонстрировал, что очищенный материал является чистым; никакие другие пики UV-сигнала не наблюдались (фиг. 6В). Кроме того, рассчитанная молекулярная масса ~96-106 кДа соответствовала ожидаемой молекулярной массе гликозилированного тримерного полипептида (фиг. 6С).

Приведенные выше данные указывали на то, что очистка полипептидов была достигнута с помощью простого 2-стадийного протокола, который приводил к получению очень чистого тримерного белка с высокой эффективностью и выходом, значительно превышающим 100 мг/л надосадочной жидкости культуры.

Пример 4. Получение характеристик тримеризации полипептидов по настоящему изобретению с помощью эксклюзионной хроматографии в присутствии связывающих Fab-фрагментов.

Получение характеристик.

Укладку и температурную стабильность очищенных полипептидов оценивали с помощью (i) анализа методом SEC-MALS в присутствии Fab-фрагментов, (ii) твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и (iii) дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF).

Связывание в растворе Fab-фрагментов с полипептидами по настоящему изобретению (также называемыми "белками мини-НА") отслеживали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) и анализа методом многоугольного рассеяния света (MALS) с использованием системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent) и устройства miniDAWN TREOS, соединенного с детектором показателя преломления Optilab T-rEX (Wyatt Technology). В общей сложности 40 мкг полипептида или Fab-фрагментов mAb CR6261, CR9114 и антитела отрицательного контроля вносили в колонку TSKgel G3000SWxl (Sigma Aldrich), уравновешенную подвижным буфером (150 mM NaPi, 50 mM NaCl, pH 7,0). Образование комплекса подтверждали с помощью анализа полипептидов, инкубируемых в присутствии 1,2-кратного молярного избытка Fab-фрагментов. Данные анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6, а расчеты молекулярной массы производили, исходя из сигнала показателя преломления.

Авидность CR6261 и CR9114, связывающихся с полипептидами, оценивали с помощью измерений методом биослойной интерферометрии с использованием Octet RED384 (ForteBio). Биотинилированные антитела иммобилизовали на биосенсорах Dip and Read со стрептавидином (SA) для кинетического анализа (ForteBio). Кривые связывания в режиме реального времени измеряли путем применения сенсора в отношении серии двукратных разведений полипептида в 10х концентрированном буфере для кинетического анализа (ForteBio), разбавленном в PBS. Начальные концентрации полипептидов находились в диапазоне 0,15-10 нМ. Константы диссоциации (KD) определяли с помощью анализа в стационарном состоянии, исходя из модели связывания 1:1 для bnAb с полипептидами.

Кроме того, связывание антител и однодоменных антител (SD) с полипептидами стеблевого домена по настоящему изобретению оценивали с помощью ELISA. Вначале поверхность планшетов с высокой степенью связывания OptiPlate-96 (Perkin Elmer) покрывали 50 мкг на лунку белка в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). После инкубирования в течение ночи при 4°C, промывания (три раза с помощью PBS+0,05% Tween-20), блокирования (1,5 часа при комнатной температуре с помощью PBS+0,05% Tween-20+1% бычий сывороточный альбумин) и промывания (три раза с помощью PBS+0,05% Tween-20) планшеты инкубировали в течение 1 часа при RT с mAb и SD в серии трехкратных разведений с начальной концентрацией 70 нМ или 100 нМ соответственно. После еще одного промывания (три раза с помощью PBS+0,05% Tween-20) добавляли пероксидазу хрена, конъюгированную с мышинным антителом к IgG человека (Jackson), в разведении 1:1000 в блокирующем буфере (PBS+0,05% Tween-20+1% бычий сывороточный альбумин). После инкубирования в течение еще 1 часа при RT и последующего промывания (три раза с помощью PBS+0,05% Tween-20) добавляли хемилюминесцентный субстрат BM для ELISA (Roche), и после 15-минутного инкубирования измеряли люминесцентный сигнал с помощью планшет-ридера Synergy Neo (Perkin Elmer). Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) рассчитывали с помощью набора Spotfire (Tibco Software Inc.). EC₅₀ непосредственно коррелирует с силой связывания соответствующего антитела и, таким образом, является мерой качества антигена, т.е. его надлежащей укладки и стабильности.

Температурную стабильность белка определяли с помощью DSF путем отслеживания флуоресцентного испускания раствора полипептида (6 мкг) в присутствии 5х красителя Sypro Orange (ThermoFisher Scientific). При постепенном повышении температуры от 25°C до 95°C (60°C в час) полипептиды разво-

рачиваются, а флуоресцентный краситель связывается с доступными гидрофобными остатками. Кривые плавления измеряли с использованием аппарата ViiA7 для ПЦР в режиме реального времени (Applied BioSystems), а значения T_{m50} рассчитывали с помощью набора Spotfire (Tibco Software Inc.). Значения T_{m50} представляют собой температуру, при которой 50% белка разворачивается, и, таким образом, являются мерой температурной стабильности полипептидов. Кроме того, также определяли индуцированную теплом денатурацию с помощью DSC, в ходе которой определяли среднюю точку теплового перехода (T_m) путем отслеживания разницы в подводимой энергии между образцом и эталонной кюветой с использованием системы MacroCal DSC (Malvern). При концентрации 1 мг/мл образцы постепенно нагревали от 20°C до 90°C (100°C за час), и циклы анализировали с помощью программного обеспечения Origin (Malvern). Исходя из графиков зависимости теплоемкости (ккал/моль/°C) от температуры (°C), рассчитывали значения T_m .

Результаты и выводы.

Теоретическая молекулярная масса тримерных полипептидов, в основе которых лежат только аминокислоты, составляет ~90 кДа, однако, поскольку каждый белок содержит 5 мотивов N-связанного гликозилирования (NxT/S), молекулярная масса будет выше при получении в системе экспрессии на основе клеток млекопитающих. Рассчитанные значения молекулярной массы, определенные с помощью анализа методом SEC-MALS, находились в диапазоне 96-106 кДа, что указывает на то, что белки, как и ожидалось, были в значительной степени гликозилированными (табл. 1).

Табл. 1. Молекулярная масса полипептидов по настоящему изобретению (второй столбец) и полипептидов в комплексе с Fab-фрагментами bnAb CR6261 и CR9114 (третий и четвертый столбцы), определенная с помощью SEC-MALS с использованием сигнала для показателя преломления. Молекулярная масса (MW) Fab6261 и Fab9114 была определена как составляющая ~44 кДа.

Таблица 1

ID полипептида	MW полипептида (кДа)	MW полипептида + Fab6261 (кДа)	MW полипептида + Fab9114 (кДа)
UFV5367	98	204	228
UFV160655	96	204	225
UFV5369	97	212	225
UFV160656	103	217	235
UFV160664	98	211	226
UFV160665	106	235	254

Связывание антител с полипептидами указывает на правильную укладку полипептидов и присутствие правильно свернутых эпитопов для нейтрализующих антител широкого спектра действия (bnAb). В растворе связывание Fab-фрагментов CR9114, CR6261 и несвязывающего Fab (отрицательного контроля) оценивали с помощью анализа методом SEC-MALS, как описано выше. При связывании Fab-фрагмента с полипептидом увеличение молекулярной массы приведет к видимому сдвигу пика (сокращению времени удерживания) на SEC. Кроме того, отслеживание сигнала MALS позволяет рассчитать молекулярную массу образовавшегося комплекса. Как и предполагалось, Fab-фрагмент, используемый в качестве отрицательного контроля, не связывался, т.е. при добавлении Fab-фрагмента не наблюдался сдвиг пика полипептида (фиг. 7А). В отличие от этого, при инкубировании с двумя другими Fab-фрагментами наблюдался четкий сдвиг пика в сторону более короткого времени удерживания (фиг. 7В и С). Кроме того, определение молекулярной массы комплекса указывало на то, что полипептид связывает 3 Fab-фрагмента (табл. 1), что подтверждает тот факт, что все три мономера в тримерном полипептиде правильно свернуты и доступны для антител.

Для дополнительной оценки качества и укладки полипептидов константу диссоциации (K_D) для связывания bnAb CR6261 и CR9114 определяли с помощью биослойной интерферометрии (табл. 2). Для всех полипептидов авидность связывания была ниже 1 нМ, что указывает на то, что в тримерных полипептидах представлена нативная поверхность стеблевого домена НА.

Табл. 2. Связывание CR6261 и CR9114 с полипептидами стеблевого домена по настоящему изобретению. Значения K_D для связывания CR6261 и CR9114, определенные с помощью биослойной интерферометрии и анализа в стационарном состоянии. Для сравнения брали полноразмерный НА H1N1 A/Brisbane/59/07.

Таблица 2

ID полипептида	K _D (нМ)	
	CR6261	CR9114
HA Brisbane	1,1	0,71
UFV5367	0,48	0,45
UFV160655	0,55	0,49
UFV5369	0,97	0,56
UFV160656	0,60	0,54
UFV160664	0,57	0,46
UFV160665	0,56	0,39

Кроме того, связывание антител оценивали с помощью ELISA. Исходя из S-кривых, рассчитывали значения EC₅₀, которые подтверждали надлежащую укладку полипептидов. Оба антитела демонстрировали очень сильное связывание при значениях EC₅₀ ниже 1 нМ (табл. 3).

Таблица 3

Сила связывания антител с очищенными полипептидами, определенная с помощью ELISA (средние значения EC₅₀ в нМ согласно S-кривым из 3 независимых анализов)

ID полипептида	CR6261	CR9114
UFV5367	0,417	0,410
UFV160655	0,396	0,400
UFV5369	0,391	0,389
UFV160656	0,432	0,410
UFV160664	0,395	0,379
UFV160665	0,425	0,409

Термостабильность является мерой устойчивости полипептидов при воздействии стресса и, таким образом, стабильности полипептидов. Полипептиды по настоящему изобретению постепенно нагревали в присутствии флуоресцентного красителя, который в ходе эксперимента связывался с несвернутым белком, и полученное изменение интенсивности флуоресценции использовали для расчета значений T_{m50} (табл. 4). В то время как исходные разработанные структуры (UFV5367 и UFV5369) демонстрировали значение T_{m50}, составляющее соответственно ~52 и ~57°C, полипептиды по настоящему изобретению, что удивительно, демонстрировали значительно более высокие (на величину до ~7°C) значения, что указывает на значительное улучшение стабильности. Аналогичное различие между исходными разработанными структурами и полипептидами по настоящему изобретению наблюдалось для значений T_m, определяемых с помощью DSC. В целом значения T_m (DSC) были на ~2°C выше, чем значения T_{m50} (DSF), что было связано с различием в способе определения этих значений; в случае с DSC температуру определяли на максимуме пика, тогда как в случае с DSF температуру определяли на 1/2 высоты пика.

Таблица 4

Обзор значений T_{m50} очищенных полипептидов, определенных с помощью DSF и DSC

ID полипептида	T _{m50} (°C)	
	DSF	DSC
UFV5367	51,8±0,09	-
UFV160655	58,5±0,21	-
UFV5369	57,2±0,08	59,1±0,01
UFV160656	64,1±0,14	66,2±0,07
UFV160664	63,3±0,12	65,3±0,01
UFV160665	62,5±0,16	65,2±0,16

Молекулярная масса полипептидов, наблюдаемое связывание с Fab-фрагментами в растворе и сильное связывание с Ab указывали на то, что исходные разработанные структуры и полипептиды по настоящему изобретению являются примерными и хорошо свернутыми. Кроме того, как указывают рассчитанные значения T_{m50}/T_m, полипептиды по настоящему изобретению были значительно более устойчивыми к тепловому стрессу по сравнению с исходными разработанными структурами. Данные о связывании

вании и данные о термостабильности в совокупности указывают на то, что полипептиды по настоящему изобретению являются тримерными в растворе, правильно свернуты (3 эпитопа) и демонстрируют значительно улучшенную термостабильность по сравнению с их исходными разработанными структурами.

Пример 5. Альтернативные делеции, линкеры и последовательности головного домена в соответствии с настоящим изобретением.

Разработанные структуры.

Описанные выше полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (НА) вируса гриппа по настоящему изобретению получали из полноразмерного НА посредством делеции части домена НА1, содержащей аминокислоты от положения 47 до аминокислоты в положении 306 включительно. Линкерную последовательность не вводили. В исходных разработанных структурах делеция охватывала аминокислоты 46-306, и два конца НА1 после делеции были соединены искусственным "линкером GGGG" (фиг. 8).

В этом примере исследовали дополнительные альтернативные положения разрезания головного домена и альтернативные гомологичные линкеры. В табл. 5 показаны альтернативные положения разрезания для удаления головного домена НА1. Концы НА1 исходной разработанной структуры указаны серым цветом. Конструкция UFV160360 (SEQ ID NO: 63) предусматривает делецию от аминокислоты в положении 46 до аминокислоты в положении 306 включительно и линкер 4G, замещающий подвергнутой делеции часть в домене НА1, и, кроме того, содержит точечные мутации Y392P, R404Q, E434Q и S442A. Были получены новые конструкции, в которых были включены до 7 дополнительных аминокислотных остатков домена НА1 (верхняя нить НА1) - первого (N-концевого) домена НА1 - и до 4 дополнительных аминокислотных остатков нижней нити НА1 (второго или C-концевого домена НА1) или были подвергнуты делеции до 2 аминокислотных остатков, за счет чего изменялся размер делеции головного домена. Все эти конструкции также содержали точечные мутации Y392P, R404Q, E434Q и S442A.

Табл. 5. Альтернативные делеции головного домена (см. также фиг. 5). Символ * указывает на мутацию свободного цистеина (C) по типу замены на G. Номера аминокислотных положений указывают на аминокислотное положение в соответствии с системой нумерации H3.

Таблица 5

	№ UFV	Верхняя нить НА1													Делеции головного домена													Нижняя нить НА1			
A/Brisbane/5 9/07		N	L	L	E	N	S	H	N	G	K				...	I	G	K	C	P	K	Y	V	K							
A/California/ 07/09		N	L	L	E	D	K	H	N	G	K	L	C	K	...	I	G	E	C	P	K	Y	V	R							
UFV160360		N	L	L	E	D	G	G	G	G													K	Y	V	C					
№ положения		41	42	43	44	45	46	47	48	48	50	51	52	53	30	30	30	30	30	30	30	30									
															2	3	4	5	6	7	8										

Таблица 6

	№	Верхняя нить HA1	Введенные линкеры													Нижняя нить HA1									
		N	L	L	E	N	S	H	N	G	K					...	I	G	K	C	P	K	Y	V	K
A/Brisbane/5 9/07		N	L	L	E	N	S	H	N	G	K					...	I	G	K	C	P	K	Y	V	K
A/California/ 07/09		N	L	L	E	D	K	H	N	G	K	L	C	K	...	I	G	E	C	P	K	Y	V	R	
№ положения AA		4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5						30	30	30	30	30	310	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3					5	6	7	8	9		
UFV160360		N	L	L	E	D	G	G	G	G												K	Y	V	C
	UFV160 380	N	L	L	E	D	A	G	S	G												K	Y	V	C
	UFV160 381	N	L	L	E	D	A	G	S													K	Y	V	C
	UFV160 382	N	L	L	E	D	A	G	S	G	I											K	Y	V	C
	UFV160 383	N	L	L	E	D	A	G	S	G	I													V	C
	UFV160 384	N	L	L	E	D	G	S	G	I												K	Y	V	C
	UFV160 385	N	L	L	E	D	G	S	G													K	Y	V	C
	UFV160 386	N	L	L	E	D	H	A	G	A												K	Y	V	C
	UFV160 387	N	L	L	E	D	D	Q	E	G												K	Y	V	C
	UFV160 388	N	L	L	E	D	D	T	P	V												K	Y	V	C
	UFV160 389	N	L	L	E	D	F	P	K	T												K	Y	V	C
	UFV160 390	N	L	L	E	D	E	P	G	D												K	Y	V	C
	UFV160 391	N	L	L	E	D	E	P	G													K	Y	V	C
	UFV160 392	N	L	L	E	D	T	G	N	L												K	Y	V	C
	UFV160 393	N	L	L	E	D	T	P	S	S												K	Y	V	C
	UFV160 394	N	L	L	E	D	T	P	S													K	Y	V	C
	UFV160 395	N	L	L	E	D	A	T	G	N												K	Y	V	C
	UFV160 396	N	L	L	E	D	Y	P	G	D												K	Y	V	C
	UFV160 397	N	L	L	E	D	Y	P	G	D														V	C

Получение характеристик.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, приведенные в табл. 5 и 6, синтезировали (GenScript)

и клонировали в плазмиду pcDNA2004 (внутрилабораторно модифицированный вектор pcDNA3 с усиленным промотором CMV). Полипептиды, содержащие С-концевую последовательность FLAG-линкер-His-метка для целей скрининга, получали в линии эукариотических клеток Expi293F в микромасштабе (200 мкл). Вкратце, клетки высевали в формате 96-луночных микропланшетов (Greiner) при плотности клеток $2,5E+06$ жизнеспособных клеток (vc)/мл в Opti-MEM (Gibco). Клетки транзистентно трансфицировали с помощью набора для трансфекции ExpiFectamine 293 (Gibco) и инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 250 об./мин., 8% CO₂ и 75% влажности. Образцы надосадочной жидкости культуры собирали путем центрифугирования (10 мин. при 400 × g) с использованием белых 96-луночных фильтровальных планшетов (мембрана из PVDF с размером пор 0,22 мкм) для удаления агрегатов и клеточного дебриса.

Количество полипептидов, присутствующих в надосадочной жидкости культуры, укладку белка и содержание тримеров во всех случаях оценивали с помощью гомогенного анализа усиления (AlphaLISA). Для анализа использовали соответствующие разведения полипептида в линейном диапазоне кривой, и все данные нормализовали относительно конструкции UFV160360 (SEQ ID NO: 63), которую принимали за 100%.

Относительное количество полипептида в собранной надосадочной жидкости культуры определяли с использованием донорных гранул с никелем (Perkin Elmer) и акцепторных гранул с антителом к FLAG (Perkin Elmer). Использовали соответствующие разведения надосадочной жидкости культуры в линейном диапазоне кривой, чтобы избежать "хук"-эффекта.

Подобным образом, укладку экспрессированных полипептидов подтверждали путем оценки связывания антител CR9114 (2 нМ) и однодоменного SD15004 (2 нМ). Для выявления связывания антител использовали акцепторные гранулы с антителом к IgG человека (Perkin Elmer) и донорные гранулы с никелем (Perkin Elmer), для выявления связывания меченного Strep-Tactin однодоменного антитела использовали акцепторные гранулы, покрытые антителом к His (Perkin Elmer), и донорные гранулы, покрытые Strep-Tactin (Perkin Elmer).

Содержание мультимеров измеряли посредством одновременного связывания CR9114 (2 нМ) и меченного Strep-Tactin SD15016 (2 нМ) с использованием протокола, аналогичного описанному в примере 2. Полипептид титровали, исходя из концентрации белка, определяемой с помощью OСТЕТ. Только тримерные молекулы, обеспечивающие связывание обоих антител, дают сигнал в этом анализе (в отличие от мономеров, димеров и потенциальных агрегатов).

Результаты и выводы.

В целом, полипептиды экспрессировались на сходном уровне относительно эталонного белка (UFV160360), и не наблюдались существенные различия между разработанными структурами с альтернативными положениями разрезания (т.е. альтернативными делениями головных доменов) и разработанными структурами, в которых концы HA1 были соединены с помощью линкера, происходящего из головного домена (фиг. 9А). Подобным образом, не наблюдались существенные различия для связывания bAb CR9114 (фиг. 9В).

В отличие от этого, наблюдались некоторые различия в относительном содержании тримеров (фиг. 9С); разработанные структуры были менее склонны к образованию тримерного мини-НА. В среднем, для разработанных структур, в которые был введен альтернативный разрез, наблюдалось ~ 2-кратное уменьшение, тогда как среди конструкций, в которых "линкер GGGG" замещен последовательностью из головного домена, наблюдалось ~3-кратное уменьшение.

Эти результаты показывают, что, хотя содержание тримеров несколько уменьшилось, были получены хорошо экспрессирующиеся и стабильные полипептиды стеблевого домена, которые были правильно свернуты для презентации эпитопа для нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114.

Пример 6. Видоизменения участка расщепления HA1/HA2: нокаут, одноосновный и многоосновный участок расщепления.

Расщепление белка HA0 вируса гриппа (на HA1 и HA2) требуется для его активности, что облегчает проникновение вирусного генома в клетки-мишени, вызывая слияние мембраны хозяина с вирусной мембраной. Все полипептиды по настоящему изобретению, описанные выше, экспрессировались с нокаут-мутацией R329Q в участке расщепления для предотвращения предполагаемого расщепления молекулы в ходе получения *in vitro* и/или *in vivo*.

В этом примере несколько полипептидов стеблевого домена экспрессировались с природным одноосновным участком расщепления или содержали многоосновный участок расщепления, например, участок расщепления фурином (табл. 7). Полипептиды также содержали мутации в положениях 392 и 434.

Варианты участка расщепления

ID полипептида	Участок расщепления	Последовательность
UFV150850	Нокаутный	R329Q
UFV160302	Одноосновный	R329 (дикий тип)
UFV160301	Многоосновный	RRRKK
UFV160503	Многоосновный	RKRR

Анализ надосадочной жидкости культуры.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, приведенные в табл. 7, синтезировали, как описывается в примере 5.

Уровень экспрессированного полипептида в собранной надосадочной жидкости культуры оценивали с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы OCTET. Вкратце, биотинилированное mAb CR9114 иммобилизовали на биосенсорах, покрытых стрептавидином (SA) (Pall FогéBio), после чего строили калибровочную кривую путем оценивания сдвига связывания серии разведений хорошо описанного очищенного гомологичного полипептида. Затем измеряли сдвиг связывания предварительно разбавленной собранной надосадочной жидкости культуры, содержащей полипептид (5-15 мкг/мл, разбавленный в буфере для кинетического анализа), и концентрацию рассчитывали с помощью построенной нормативной кривой.

Результаты и выводы.

Для полипептидов, в которые был вставлен одноосновный (R) или многоосновный (RRRKK) участок расщепления, т.е. UFV160302 и UFV160301 соответственно, не наблюдался эффект в отношении уровня экспрессии (фиг. 10). Оба полипептида экспрессировались на сходных уровнях и демонстрировали сходные уровни содержания тримеров по сравнению с эталонным полипептидом UFV150850, который является устойчивым к расщеплению протеазами благодаря мутации аминокислоты в положении 329 по типу замены на Q.

Для второго введенного многоосновного участка расщепления (RKRR) наблюдалось ~2-кратное уменьшение уровня экспрессии и содержания тримеров (UFV160503).

Пример 7. Иллюстративные последовательности GCN4 или тримеризационных доменов с альтернативным гептадным повтором.

Разработанные структуры.

В полипептидах по настоящему изобретению, описанных выше, N-конец C-спирали (верхняя часть молекулы, см. фиг. 1C), в частности, аминокислотную последовательность, начинающуюся с аминокислоты в положении 405 и продолжающуюся до аминокислоты в положении 419 включительно домена HA2, замещали тримеризационным доменом GCN4 под SEQ ID NO: 113 для улучшения склонности к тримеризации молекулы. В этом примере оптимизацию областей контакта в суперспиралях успешно исследовали путем оптимизации последовательности гептадного повтора C-спирали. В таблице 8 показана альтернативная тримеризационная последовательность в полипептиде UFV160090 (SEQ ID NO: 56). Мутации в N-концевой области C-спирали выделены светло-серым цветом. Тримеризационная последовательность UFV160097 (SEQ ID NO: 58) идентична таковой в полипептидах, описываемых в примере 1. Различия в последовательности гептадного повтора в N-концевой части C-спирали с HA дикого типа выделены серым цветом.

Табл. 8. Последовательности GCN4 или тримеризационных доменов с альтернативным гептадным повтором (для полипептидов, полученных из HA A/California/07/09). Числа вверху указывают на аминокислотное положение в соответствии с системой нумерации H3.

Таблица 8

Тримеризационный домен C-спирали	№ UFV	C-спираль (аминокислотное положение N-концевой области)														
		40	40	40	40	40	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
		5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A/California/07/09 wt	wt	R	I	E	N	L	N	K	K	V	D	D	G	F	L	D
GCN4	160097	C	M	K	Q	I	E	D	K	I	E	E	I	E	S	K
Альтернативный гептадный повтор	160090	C	I	E	A	K	E	K	K	V	D	D	I	E	K	K

Анализ надосадочной жидкости культуры.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, приведенные в табл. 8, синтезировали, как описано выше в примере 5.

Все оценки собранных образцов надосадочной жидкости культуры выполняли с помощью AlphaLISA аналогично описанному в примере 5. Данные о связывании CR9114 нормализовали относительно уровня экспрессии.

Результаты и выводы.

Оценивание с помощью AlphaLISA собранных образцов надосадочной жидкости культуры в отношении уровня экспрессии полипептидов, содержания тримеров и связывания CR9114 указывало на то, что альтернативная оптимизация области контакта тримеров в С-спирали (т.е. отличная от GCN4-подобного повтора, присутствующего в полипептидах, описываемых выше) была допустимой. Наблюдался улучшенный уровень экспрессии белка (~2-кратный), хотя наблюдалось снижение содержания тримеров (~2-кратное). На связывание CR9114 влияние не оказывалось (фиг. 11).

Пример 8. Альтернативные усечения на С-конце полипептидов стеблевого домена по настоящему изобретению.

Разработанные структуры.

Гемагглютинин представляет собой мембранный белок, который расположен на поверхности вирусной частицы, при этом С-концевая часть белка погружена в вирусную мембрану. Для получения растворимых вариантов полипептидов по настоящему изобретению трансмембранный домен был подвергнут делеции путем усечения в начале трансмембранного домена (ТМ). Кроме того, также оценивали положения альтернативного усечения (таблицы 9 и 10).

Табл. 9. Альтернативные усечения С-конца домена HA2 (для полипептидов, полученных из HA A/Brisbane/59/07). Числа вверху указывают на аминокислотное положение в соответствии с системой нумерации H3.

Таблица 9

№ UFV	Аминокислотное положение и последовательность С-конца разработанных структур растворимого мини-НА по сравнению с wt																				ТМ-домен			
	49 6	49 7	49 8	49 9	50 0	50 1	50 2	50 3	50 4	50 5	50 6	50 7	50 8	50 9	51 0	51 1	51 2	51 3	51 4	51 5	51 6	51 7	51 8	51 9
A/Brisbane/59/07	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV5367	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I				
UFV150565	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV150566	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y	Q	I	L	A		
UFV150567	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G	V	Y						
UFV150568	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S	M	G								
UFV150569	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L	E	S										
UFV150570	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V	K	L												
UFV150571	K	L	N	R	E	K	I	D	G	V														
UFV150572	K	L	N	R	E	K	I	D																
UFV150573	K	L	N	R	E	K																		
UFV150574	K	L	N	R																				

Табл. 10. Усечение С-конца домена HA2 (для полипептидов, полученных из HA A/California/07/09). Числа вверху указывают на аминокислотное положение в соответствии с системой нумерации H3.

Таблица 10

№ UFV	Аминокислотное положение и последовательность С-конца разработанных структур растворимого мини-НА по сравнению с wt																				TM-домен			
	49 6	49 7	49 8	49 9	50 0	50 1	50 2	50 3	50 4	50 5	50 6	50 7	50 8	50 9	51 0	51 1	51 2	51 3	51 4	51 5	51 6	51 7	51 8	51 9
A/California/07/09	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV5369	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I				
UFV150575	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I	L	A	I	Y
UFV150576	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y	Q	I	L	A		
UFV150577	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R	I	Y						
UFV150578	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S	T	R								
UFV150579	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L	E	S										
UFV150580	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V	K	L												
UFV150581	K	L	N	R	E	E	I	D	G	V														
UFV150582	K	L	N	R	E	E	I	D																
UFV150583	K	L	N	R	E	E																		
UFV150584	K	L	N	R																				

Анализ надосадочной жидкости культуры.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, приведенные в табл. 9 и табл. 10, синтезировали, как описывается в примере 5.

Собранные образцы надосадочной жидкости культуры анализировали в отношении наличия экспрессированного полипептида с помощью вестерн-блоттинга. Образцы прогоняли в 4-12% геле Bis-Tris для SDS-PAGE (ThermoFisher Scientific) в невосстанавливающих условиях и переносили на мембрану из PVDF с помощью системы iBlot id 2.0 (ThermoFisher Scientific). Для визуализации полос, соответствующих полипептидам, мембрану блокировали 0,2% блокирующим средством (молочный порошок, BioRad) в TBST перед инкубированием со специфическими белками гемагглютиниными, полученными из штамма H1, и биотинилированным однодоменным антителом (вирус гриппа б) в достаточном разведении в блокирующем буфере. После промывания (TBST) мембрану инкубировали со стрептавидином, меченым HRP (Vecton Dickinson, разведение 1:250 в блокирующем буфере). Затем, после еще одной стадии промывания (TBST), полосы белков визуализировали путем инкубирования с субстратом пероксидазы TrueBlue (KPL).

Связывание нейтрализующего моноклонального антитела широкого спектра действия CR9114 с экспрессированными полипептидами по настоящему изобретению оценивали в собранной надосадочной жидкости культуры с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы OCTET. Вкратце, образцы надосадочной жидкости в двукратном разведении в буфере для кинетического анализа (Pall FortéBio) оценивали с помощью биосенсоров, покрытых стрептавидином (SA) (Pall FortéBio), нагруженных биотинилированным CR9114. Подбор кривых в течение первых 20 секунд стадии ассоциации выполняли для вычисления значений K_{on} ; концентрация полипептидов в образцах надосадочной жидкости культуры была установлена равной 50 мМ, и кривые были подобраны в модели 1:1. Имитационный образец включали в качестве отрицательного контроля.

Результаты и выводы.

Наблюдался минимальный эффект альтернативных С-концевых усечений в отношении уровня экспрессии полипептидов. Все варианты, за исключением UFV150565 и UFV150574, демонстрировали четкую полосу на высоте, соответствующей тримерам, в вестерн-блот-анализе собранных образцов надосадочной жидкости культуры (фиг. 12А).

Анализ OCTET указывал на то, что почти все разработанные структуры (за исключением UFV150575) действительно связывались с иммобилизованным CR9114 (фиг. 12В), хотя для вариантов с С-концевым усечением наблюдались в целом более низкие значения K_{on} по сравнению с эталонными

разработанными структурами 5367 и 5369. Это, вероятно, частично объясняется базовой процедурой подбора кривой, предполагающей идентичную концентрацию белка для всех разработанных структур; однако, связывание полипептида с антителом очевидно.

Результаты четко показывают, что возможны усечения до положения 502.

Пример 9. Межпротомерные дисульфидные мостики; альтернативные положения.

Разработанные структуры.

Полипептиды по настоящему изобретению очищали из надосадочной жидкости культуры в виде ковалентных тримерных белков. В полипептидах, как описано ранее, ковалентная связь была сформирована путем введения двух цистеиновых остатков в В-петлю (положение 397) и С-спираль (положение 405), которые образуют дисульфидный мостик путем спаривания с цистеиновым остатком в соседнем мономере (межмономерный дисульфидный мостик). В этом примере исследовали два альтернативных положения для этих межпротомерных дисульфидных мостиков (табл. 11).

Табл. 11. Альтернативные положения для цистеиновых остатков, которые образуют межпротомерные дисульфидные мостики. * Нокаутный мотив N-связанного присоединения гликанов (NxS) в положении 400.

Таблица 11

ID полипептида	Введение цистеина в аминокислотное положение	Исходный штамм вируса гриппа
UFV160090	397+405	H1N1 A/California/07/09
UFV160093	398+405	H1N1 A/California/07/09
UFV160088*	396+408	H1N1 A/Brisbane/59/07

Анализ надосадочной жидкости культуры.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, синтезировали, как описано выше.

Все оценки собранных образцов надосадочной жидкости культуры выполняли с помощью AlphaLISA, как описано в примере 7.

Результаты и выводы.

Оценивание с помощью AlphaLISA собранных образцов надосадочной жидкости культуры в отношении уровня экспрессии полипептидов, содержания тримеров и связывания CR9114 указывало на то, что альтернативные межпротомерные дисульфидные мостики демонстрировали аналогичные или лучшие результаты, чем у эталонного полипептида UFV160090 (фиг. 13). Эти данные указывали на то, что введение цистеиновых остатков в положения 398 и 405 (UFV160093), а также 396 и 408 (UFV160088) обеспечивает альтернативу межпротомерному дисульфидному мостику, образуемому введенными цистеиновыми остатками в положениях 397 и 405 (UFV160090).

Пример 10. Защита от смертельного контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07 после иммунизации мышей, ранее не получавших лечение, полипептидами по настоящему изобретению.

В этом примере оценивали защитную эффективность (исходя из доли выживших в конце периода последующего наблюдения) диапазона доз UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта AlOH₃ по сравнению с животными, получавшими имитацию иммунизации (PBS), и с фиксированной дозой UFV4900 (исследовательской).

Группы из 8-11 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) получали 2-кратную внутримышечную иммунизацию диапазоном доз растворимого тримерного UFV160664 с добавленными в качестве адьюванта 50 мкг AlOH₃ (составленными в виде 2% Alhydrogel) с 3-недельным интервалом. Диапазон доз состоял из 4 10-кратных разведений, начиная с 30 мкг и до 0,03 мкг включительно. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения мышей дважды иммунизировали с помощью 30 мкг растворимого тримерного UFV4900 (n=10), при этом 2 иммунизации с помощью PBS служили в качестве отрицательного контроля (n=11). Через четыре недели после последней иммунизации у мышей брали кровь для анализа иммунного ответа (ELISA для полноразмерного (FL) HA H1N1 A/Brisbane/59/07), и спустя один день мышей подвергали контрольному заражению 25 × LD₅₀ адаптированного к мышам вируса для контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07 и отслеживали (выживаемость, масса, клинические показатели) в течение 3 недель. Доля выживших в конце периода последующего наблюдения служила параметром первичного исхода.

Результаты.

Было показано, что UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта AlOH₃ был иммуногенным, поскольку титры FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, определенные с помощью ELISA, были значимо повышены (P < 0,001; U-критерий Манна-Уитни со ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы, и с поправкой Бонферрони для множественных сравнений) по сравнению с группой, получавшей PBS, для всех тестируемых доз. Титры у животных, иммунизированных дозой 30 мкг UFV160664, были сопоставимы с таковыми в группе, получавшей 30 мкг UFV4900 (фиг. 15).

Кроме того, UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта AlOH_3 обеспечивал значимую защиту ($P \leq 0,003$; точный критерий Фишера, поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) во всех дозах, за исключением 0,03 мкг, по сравнению с группой, получавшей PBS. Доля выживших в группе, получавшей 30 мкг UFV160664 (87,5%), была сопоставима с таковой в группе, получавшей 30 мкг UFV4900 (90%) (фиг. 16; верхняя панель). Потеря массы тела (определяемая по площади под кривой) была значимо снижена ($P \leq 0,012$; ANOVA, 2-кратная поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) при всех дозах, за исключением 0,03 мкг, по сравнению с группой, получавшей PBS. Потеря массы тела в группе, получавшей 30 мкг UFV160664, была сопоставима с таковой в группе, получавшей 30 мкг UFV4900 (фиг. 16; нижняя панель).

Выводы.

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта AlOH_3 является иммуногенным и обеспечивает защиту в мышинной модели смертельного контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07. Иммуногенность и защитная эффективность сопоставимы с таковыми у UFV4900 с добавленным в качестве адьюванта AlOH_3 .

Пример 11. Защита от смертельного контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34 после иммунизации мышей, ранее не получавших лечение, полипептидами по настоящему изобретению.

В этом примере оценивали защитную эффективность (исходя из доли выживших в конце периода последующего наблюдения) диапазона доз UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvlex по сравнению с животными, получавшими имитацию иммунизации (PBS), и с фиксированной дозой UFV4900 (исследовательской).

В этом случае также группы из 8-11 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) получали 2-кратную внутримышечную иммунизацию диапазоном доз растворимого тримерного UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% (об./об.) Adjuvlex с 3-недельным интервалом. Диапазон доз состоял из 4 10-кратных разведений, начиная с 30 мкг и до 0,03 мкг включительно. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения мышей дважды иммунизировали с помощью 30 мкг растворимого тримерного UFV4900 ($n=10$), при этом 2 иммунизации с помощью PBS служили в качестве отрицательного контроля ($n=11$). Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению $12,5 \times \text{LD}_{50}$ адаптированного к мышам вируса для контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34 и отслеживали (выживаемость, масса, клинические показатели) в течение 3 недель. Доля выживших в конце периода последующего наблюдения служила параметром первичного исхода.

Результаты.

Было показано, что UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvlex обеспечивал значимую защиту ($P \leq 0,003$; точный критерий Фишера, поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) во всех дозах, за исключением 0,03 мкг, по сравнению с группой, получавшей PBS. Доля выживших в группе, получавшей 30 мкг UFV160664 (100%), была идентична таковой в группе, получавшей 30 мкг UFV4900 (100%) (фиг. 17; верхняя панель).

Потеря массы тела (определяемая по площади под кривой) была значимо снижена ($P \leq 0,026$; ANOVA, 2-кратная поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) при всех дозах по сравнению с группой, получавшей PBS. Потеря массы тела в группе, получавшей 30 мкг UFV160664, была сопоставима с таковой в группе, получавшей 30 мкг UFV4900 (фиг. 17, нижняя панель).

Выводы.

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvlex обеспечивает защиту в мышинной модели смертельного контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34. Защитная эффективность сопоставима с таковой у UFV4900 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvlex.

Пример 12. Полипептиды по настоящему изобретению являются иммуногенными и демонстрируют сопоставимую эффективность по сравнению с вакциной, являющейся стандартом лечения, в модели контрольного заражения H1N1 A/Netherlands/602/09 на хорьках, ранее не получавших лечение.

В этом примере оценивали иммуногенность и защитную эффективность *in vivo* (исходя из вирусной нагрузки в легких в конце периода последующего наблюдения) двух доз UFV160664 по сравнению с животными, иммунизированными только адьювантом, и с сезонной вакциной против гриппа, являющейся стандартом лечения, в модели контрольного заражения H1N1 A/Netherlands/602/09 на хорьках, ранее не получавших лечение.

Группы ($n=6$) самок хорьков, ранее не получавших лечение, получали трехкратную внутримышечную иммунизацию с помощью 50 или 5 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvlex с интервалами в 3 недели. Группу отрицательного контроля иммунизировали только адьювантом. Эталонную группу, представляющую стандарт лечения, иммунизировали коммерчески доступной сезонной вакциной против гриппа, являющейся стандартом лечения (SoC). Через четыре недели после послед-

ней иммунизации животных подвергали интратрахеальному контрольному заражению 10^6 TCID₅₀ H1N1 A/Netherlands/602/09 в день 0. На протяжении 4-дневного периода последующего наблюдения регистрировали некоторые вирусологические и клинические параметры.

Результаты.

Было показано, что обе дозы UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex индуцировали значимо более высокие титры антитела, специфичного к HA H1 A/California/07/09, по сравнению с титрами в группе, получавшей только адьювант ($P < 0,001$; ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы), тогда как для SoC это не наблюдалось (фиг. 18). Обе дозы UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex индуцировали значимо более высокие титры антитела, специфичного к HA H1 A/California/07/09, по сравнению с титрами в группе, получавшей только адьювант ($P < 0,001$; ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы), тогда как для SoC это не наблюдалось (фиг. 18).

Кроме того, обе дозы UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex индуцировали значимо более высокие титры антитела, специфичного к стеблевому домену HA H1 A/California/07/09 (как измерено с помощью конкурентного анализа с CR9114), по сравнению с титрами в группе, получавшей только адьювант ($P < 0,001$; ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы), тогда как для SoC это не наблюдалось (фиг. 19).

Доза 50 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex и SoC значимо снижали вирусную нагрузку в легких по сравнению с титрами в группе, получавшей только адьювант (50 мкг UFV160664: $P < 0,001$, SoC: $P < 0,05$; ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы) (фиг. 20).

Выводы.

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что обе дозы UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex являются иммуногенными, и что доза 50 мкг обеспечивает защиту, сравнимую с таковой в контрольной группе, получавшей вакцину SoC.

Пример 13. Полипептиды по настоящему изобретению демонстрируют сопоставимую эффективность по сравнению с положительным контролем в модели контрольного заражения H5N1 A/Indonesia/05/05 на хорьках, ранее не получавших лечение.

В этом примере оценивали иммуногенность и защитную эффективность *in vivo* (исходя из вирусной нагрузки в легких в конце периода последующего наблюдения) двух доз UFV160664 по сравнению с животными, иммунизированными только адьювантом, и с группой положительного контроля, иммунизированной с помощью FL HA H5, гомологичного штамму для контрольного заражения (исследовательскому), в модели контрольного заражения гетеросубтипическим H5N1 A/Indonesia/05/05 на хорьках, ранее не получавших лечение.

Группы ($n=6$) самок хорьков, ранее не получавших лечение, получали трехкратную внутримышечную иммунизацию с помощью 50 или 5 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex с интервалами в 3 недели. Группу отрицательного контроля иммунизировали только адьювантом. Группу положительного контроля иммунизировали с помощью HA H5 A/Indonesia/05/05, гомологичного штамму для контрольного заражения, с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex. Через четыре недели после последней иммунизации животных подвергали интратрахеальному контрольному заражению 10^5 TCID₅₀ H5N1 A/Indonesia/05/05 в день 0. На протяжении 5-дневного периода последующего наблюдения регистрировали некоторые вирусологические и клинические параметры.

Результаты.

Было показано, что животные, иммунизированные обеими дозами UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex, и группа положительного контроля оставались живыми на протяжении периода последующего наблюдения, тогда как доля выживших в группе, получавшей только адьювант, составляла 25% (фиг. 21). Совокупная потеря массы тела на протяжении периода последующего наблюдения снижалась у четырех из 6 животных, иммунизированных с помощью 50 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex, по сравнению с группой, получавшей только адьювант. Группа положительного контроля характеризовалась снижением потери массы тела, сопоставимым с таковым у четырех животных из группы, получавшей 50 мкг UFV160664, и снижение потери массы тела было значимо меньшим по сравнению с таковым в группе, получавшей только адьювант ($P < 0,001$; ANOVA с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы) (фиг. 22).

Как в группе, получавшей 50 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex, так и в группе положительного контроля значимо снижалась вирусная нагрузка в легких по сравнению с группой, получавшей только адьювант (50 мкг UFV160664: $P < 0,01$, положительный контроль: $P < 0,05$; ANOVA для цензурированных данных с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для мно-

жественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы) (фиг. 23).

Как в группе, получавшей 50 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 5% Adjuvex, так и в группе положительного контроля значительно снижалась совокупная вирусная нагрузка в горле (по результатам ежедневного взятия мазков) по сравнению с группой, получавшей только адьювант (50 мкг UFV160664: $P < 0,05$, положительный контроль: $P < 0,001$; ANOVA с апостериорным t-критерием, поправкой Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатым тестированием, начиная с наиболее высокой дозы) (фиг. 24).

Выводы.

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что UFV160664 как в дозе 5 мкг, так и в дозе 50 мкг предупреждал смертность. Кроме того, доза 50 мкг UFV160664 снижала потерю массы тела и значительно снижала вирусную нагрузку в легких и горле, что было сопоставимо с группой положительного контроля.

Пример 14. Гуморальная и клеточная иммуногенность после иммунизации мышей, ранее не получавших лечение, аденовирусным вектором, экспрессирующим полипептид по настоящему изобретению

В этом примере оценивали гуморальную и клеточную иммуногенность диапазона доз аденовирусного вектора 26 (Ad26), содержащего нуклеиновую кислоту, экспрессирующую полипептид по настоящему изобретению (в частности, полипептид UFV 171590). Для сравнения оценивали контрольных мышей, которых иммунизировали пустым аденовирусным вектором, фиксированной дозой белка UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvex или согласно гетерологичной схеме иммунизации с примирением с помощью UFV171590 и стимулированием с помощью UFV160664 с адьювантом.

Группы самок мышей BALB/c получали две внутримышечные иммунизации с интервалом в четыре недели. Три группы по восемь мышей иммунизировали с помощью 10^8 , 10^9 либо 10^{10} вирусных частиц (vp) UFV171590. В качестве отрицательного контроля четыре мыши получали две иммунизации с помощью 10^{10} vp пустого аденовирусного вектора (пустого Ad26). Группа из пяти мышей получала две иммунизации с помощью 30 мкг растворимого тримерного белка UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvex. Группа из пяти мышей получала примиряющую иммунизацию с помощью 10 vp UFV171590 с последующей стимулирующей иммунизацией с помощью 30 мкг UFV160664 с добавленным в качестве адьюванта 2% Adjuvex. Через три недели после стимулирующей иммунизации мышей умерщвляли, и выделяли образцы крови и селезенки для анализа гуморального иммунного ответа на H1 A/California/07/09 (ELISA для полноразмерного (FL) белка и конкурентный ELISA для стеблевого домена) и клеточного иммунного ответа на пептиды UFV160664 (ELISpot для Т-клеток) соответственно.

Результаты.

Было показано, что все дозы аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, экспрессирующую полипептид по настоящему изобретению, индуцировали значимые титры связывания FL HA H1 A/California, определенные с помощью ELISA, по сравнению с иммунизацией пустым вектором (10 vp, 10 vp и 10 vp: $p < 0,001$, тобит-модель регрессии с использованием теста отношения правдоподобия) (фиг. 25). Кроме того, 10 и 10 vp UFV171590 индуцировали значимые титры антитела, специфичного к стеблевому домену HA (как измерено с помощью конкурентного анализа с CR9114), по сравнению с пустым вектором ($p < 0,001$; тобит-модель регрессии с использованием теста отношения правдоподобия) (фиг. 26). Как примирение-стимулирование с помощью UFV160664 с адьювантом, так и примирение с помощью UFV171590, стимулирование с помощью UFV160664 с адьювантом индуцировали значимые титры связывания FL HA H1 A/California/07/09 (фиг. 25) и титры антитела, специфичного к стеблевому домену HA ($p < 0,001$; тобит-модель регрессии с использованием теста отношения правдоподобия) (фиг. 26).

Кроме значимого гуморального ответа, UFV171590 индуцировал значимый ответ с участием Т-клеток, вырабатывающих IFN- γ , по сравнению с пустым вектором, как измерено после стимуляции пептидами UFV160664 с помощью ELISpot для Т-клеток (фиг. 27). Все дозы UFV171590 индуцировали значимые Т-клеточные ответы ($p < 0,001$; тобит-модель регрессии с использованием теста отношения правдоподобия), как и в группе мышей, которые получали иммунизацию путем примирения с помощью UFV171590 с последующим стимулированием с помощью UFV160664 ($p < 0,001$). Две иммунизации с помощью UFV160664 с адьювантом не индуцировали поддающийся выявлению ответ с участием Т-клеток, вырабатывающих IFN- γ (фиг. 27).

Выводы.

Было показано, что аденовирусный вектор 26, экспрессирующий полипептид по настоящему изобретению (UFV171590), индуцирует значимые гуморальные и клеточные ответы на FL HA H1 A/California/07/09 в мышинной модели при использовании гомологичной схемы иммунизации либо в комбинации со стимулированием с помощью UFV160664 с адьювантом. UFV160664 с адьювантом также индуцировал значимый гуморальный иммунный ответ, но не индуцировал поддающийся выявлению Т-клеточный ответ при отсутствии примирения с помощью UFV171590.

Пример 15. Перенос мутаций из полипептида 160664 в различные остовы из группы 1.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих.

Фрагменты ДНК, кодирующие дополнительные полипептиды по настоящему изобретению (т.е. на основе различных остовов НА, см. фиг. 28А), синтезировали (GenScript) и клонировали в плазмиду pcDNA2004 (внутрилабораторно модифицированный вектор pcDNA3 с усиленным промотором CMV). Полипептиды получали в культурах клеток Expi-CHO в экспрессионной среде ExpiCHO™ путем транзientной трансфекции с помощью ExpiFectamine™ (Gibco, ThermoFisher Scientific). К культурам клеток ExpiCHO добавляли усилитель трансфекции ExpiFectamine CHO и подпитку ExpiCHO (Gibco, ThermoFisher Scientific) через день после трансфекции. Образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие секретируемые полипептиды, собирали в день 7 путем центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Анализ надосадочной жидкости культуры.

Уровень экспрессированного полипептида в собранной надосадочной жидкости культуры оценивали с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы OCTET. Вкратце, биотинированное mAb CR9114 иммобилизовали на биосенсорах, покрытых стрептавидином (SA) (Pall FortéBio), после чего строили калибровочную кривую путем оценивания сдвига связывания серии разведений хорошо описанного очищенного гомологичного полипептида. Затем измеряли сдвиг связывания предварительно разбавленной собранной надосадочной жидкости культуры, содержащей полипептид (~5-15 мкг/мл, разбавленный в буфере для кинетического анализа), и концентрацию рассчитывали с помощью построенной градуировочной кривой.

Затем оценивали содержание полипептидов по настоящему изобретению в собранных образцах культуры Expi-CHO с помощью аналитической SEC на установке для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) серии Infinity 1260 (Agilent). Надосадочную жидкость культуры, содержащую полипептид, с количеством вводимой пробы ~3 мкг белка, за исключением UFV180500 (0,8 мкг), прогоняли (1 мл/мин.) через колонку TSKgel G3000SWxl (Sigma-Aldrich), и элюат отслеживали с помощью UV-детектирования (OD280, миллиед. опт. пл.). SEC-профили анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6 (Wyatt Technology). Укладку полипептида оценивали с помощью гомогенного анализа усиления (AlphaLISA). Этот анализ равновесия в растворе и при связывании основан на успешном связывании как донорной, так и акцепторной гранулы с полипептидом. При непосредственной близости в результате лазерного облучения донорной гранулы при 680 нм образуется поток синглетного кислорода, инициирующий химические события в близлежащей акцепторной грануле, что приводит к хемилюминесцентному испусканию при 615 нм. Анализ AlphaLISA выполняли путем одновременного добавления донорных гранул с никелем (10 мкг/мл) и акцепторных гранул с антителом к IgG человека (10 мкг/мл, обе от PerkinElmer) в надосадочную жидкость культуры в присутствии CR9114 (2 нМ) либо MD3606 (2 нМ). Образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие полипептид, титровали в диапазоне 3-кратных разведений, начиная с 1667 нг/мл. Считывание выполняли после 2 часов инкубирования (при комнатной температуре) с помощью многорежимного планшет-ридера EnSight™ (PerkinElmer).

Результаты и выводы.

Анализ трансфекционных сред ExpiCHO объемом 35 мл показал, что экспрессируются His-меченные полипептиды (фиг. 28А). Уровни экспрессии варьировались от 42 мг/л (остов H5 A/Vietnam/1203/04) до 375 мг/л (остов H1 A/California/07/09) и указывали на то, что все полипептиды хорошо экспрессируются.

Кроме того, SEC-профили (фиг. 28В) показывают, что для каждого экспрессированного полипептида поддается выявлению значительная тримерная (Т) и мономерная (М) фракция. Различия в относительном содержании тримеров и мономеров наблюдались в зависимости от используемого штамма остова. Для дополнительной оценки правильной укладки полипептида оценивали связывание релевантного антитела (CR9114) и мультидоменного антитела (MD3606) с помощью AlphaLISA. Для всех полипептидов наблюдался сигнал специфического связывания как для CR9114, так и для MD3606 (фиг. 28С). Экспрессия, SEC-профили и данные о связывании указывают на то, что мутации в соответствии с настоящим изобретением (например, мутации UFV160664, в основе которого лежит штамм A/California/07/09) могут переноситься в другие остовы из группы 1. Таким образом, все из полипептидов UFV180496, UFV180497, UFV190498, UFV180499, UFV180500 и UFV180501 были правильно свернутыми и тримерными и секретируются в надосадочную жидкость культуры.

Стандартные аминокислоты, сокращения и свойства

Аминокислота	3- буквенный код	1- буквенный код	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
Аланин	Ala	A	Неполярная	Нейтральный
Аргинин	Arg	R	Полярная	Положительный
Аспарагин	Asn	N	Полярная	Нейтральный
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Полярная	Отрицательный
Цистеин	Cys	C	Неполярная	Нейтральный
Глутаминовая кислота	Glu	E	Полярная	Отрицательный
Глутамин	Gln	Q	Полярная	Нейтральный
Глицин	Gly	G	Неполярная	Нейтральный
Гистидин	His	H	Полярная	Положительный (10%), нейтральный (90%)
Изолейцин	Ile	I	Неполярная	Нейтральный
Лейцин	Leu	L	Неполярная	Нейтральный
Лизин	Lys	K	Полярная	Положительный
Метионин	Met	M	Неполярная	Нейтральный
Фенилаланин	Phe	F	Неполярная	Нейтральный
Пролин	Pro	P	Неполярная	Нейтральный
Серин	Ser	S	Полярная	Нейтральный
Треонин	Thr	T	Полярная	Нейтральный
Триптофан	Trp	W	Неполярная	Нейтральный
Тирозин	Tyr	Y	Полярная	Нейтральный
Валин	Val	V	Неполярная	Нейтральный

Литературные источники.

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

Последовательности.

SEQ ID NO: 1: полноразмерный H1 (A/Brisbane/59/2007)
MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
ENSHNGKLCL LKGIAPQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP 100
NPENGTCPYG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESW PNHTVTGVSA 150
SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPN
200
IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL 250
EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRRGFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG 300
AINSSLPFQN VHPVTIGECF KYVRSKLRM VTGLRNIPSI QSRGLFGAIA 350
GFIEGGWTGM VDGWYGYHHQ NEQGSYAAD QKSTQNAING ITNKVNSVIE
400
KMNTQFTAVG KEFNKLERRM ENLNKKVDDG FIDIWTYNAE LLVLENERT
450
LDFHDSNVKN LYEKVKSQK NNAKEIGNGC FEFYHKCNDE CMESVKNQTY
500

DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLVSLGAIS 550
FWMCSNGSLQ CRICI 565

SEQ ID NO: 2: полноразмерный H1 (A/California/07/2009)

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKH
NGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFID
YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGN
YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVVFVGSRSYKSKFKPEIAIR
PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPVRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN
TTCQTPKGAINSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAFGIEG
GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGK
EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQL
KNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQ
ILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

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

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SH
NGKLCLLKGTAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCPGYFAD
YEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLY
PNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKR
PKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRFAFALS RFGSGIITSNAPMGECDAK
CQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAFGIEG
GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTA VGK
EFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKNQL
KNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVY
QILAIYSTVASSLVLLISLGAISFWMCSNGSLQCRICI

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

MKVKLLVLLCAFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SH
NGKLCRLKGTAPLQLGNCSVAGWILGNPECESLFSKESWSYIAETPNPENGTCPGYFA
DYELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTKGVTASC SHNGKSSFYKNLLWLTEKNG
LYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRAIYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIA
KRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALS RFGSGIITSNASMSEC
DAKCCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGF
IEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTA V
GKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVK
NQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESM
GVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 5: A/AA/Marton/1943 (H1N1)

MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SH
NGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWILGNPECESLLSERSWSYIVETPNSENGTCYPGDFID
YEELREQLSSVSSFERFEIFSKESSWPKHNTTRGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKDGS
YPNLNNSYVNNKKGKEVLVLWGVHHPNINIKDQQTLYQKENAYVSVVSSNYNRRFTPEIA

ERPKVRGQAGRMNYYWTLLKPGDTIMFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMH
 ECDTKCQTPQGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIA
 GFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFT
 AVGKEFNLEKRMENLNKKVDDGFLDIWYTNAELLVLLNERTLDFHDSNVKNLYEK
 VKNQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLE
 SMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

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

MAIYLILLFTA VRGDQICIGYHANNSTEKVD TILERNVTVTHAKDILEKTHNGKL
 CKLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRNGLCYPGSFNDYEEL
 KHLSSVKHFEKVKILPKDRWTQH TTTGGSQACA VSGNPSFFRN MVWLTKKGS DYPVA
 KGSYNNTSGEQMLI IWGVHHPIDETE QRTLYQNVGT YVSVGTSTLNKRSTPEIATRPKV
 NGLGSRMEFSWTL LDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGS SGMKTEGTLENCETKCQ
 TPLGAIN TTPFHN V HPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIA GFIEGGW
 QGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEF
 GNLERRLENLNKKMEDGFLDVWYTNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQL
 RDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLN RNEIKGVKLSMGMV
 YQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

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

MAIYLILLFTA VRGDQICIGYHANNSTEKVD TILERNVTVTHAKDILEKTHNGKL
 CKLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEEL
 KHLSSVKHFEKVKILPKDRWTQH TTTGGSRACA VSGNPSFFRN MVWLTEKGSNYPVA
 KGSYNNTSGEQMLI IWGVHHPNDEKEQRTLYQNVGT YVSVGTSTLNKRSTPDIATRPKV
 NGLGSRMEFSWTL LDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGS SGMKTEGTLENCETKCQ
 TPLGAIN TTPFHN V HPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIA GFIEGGW
 QGMIDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFS
 NLERRLENLNKKMEDGFLDVWYTNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLR
 DNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLN RNEIKGVKLSMGMV
 YQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

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

MEKIVLLFAIVSLVKS DQICIGYHANNSTEQVD TIMEKNVTVTHAQDILEK KHNG
 KLCDLDG VKPLILRDCSVAGWLLGNPM CDEFIN VPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDFND
 YEELKHL SRINHFEKI QIIPKSSWSSHEASLG VSSACPYQGKSSFFRN VVWL IKNSTYP
 TIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSK
 VNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTK
 CQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRN SPQRERRRKRGLFGAIA
 GFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFE
 AVGREFN NLERRIENLNKKMEDGFLDVWYTNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDK
 VRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLE
 SIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMC SNGSLQCRICI

>BEJOK VH CR9114 (SEQ ID NO: 9)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKSSGGTSNNY AISWVRQAPGQGLDWMGGISPI
 FGSTAYA QKFQGRVTISADIFSN TAYMELNSLTSEDTAVYFCARHGNY YYYSGMDVWG
 QGTTVTVSS

>БЕЛОК VL CR9114 (SEQ ID NO: 10)

SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVN WYQQFPGTAPKLLIYSNDQRP
 SVVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAEYYCAAWDDSLKGA VFGGGTQLTVL

>БЕЛОК VH CR6261 (SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGAEVKKPGSSVKV SCKASGGPFRSYAISWVRQ
 APGQGPEWMGGIIPFGTTKYAPKFQGRVTITADDFAGTVYME
 LSSLRSEDTAMYYCAKHMGYQVRETM DVWKGTTVTVSS

>БЕЛОК VL CR6261 (SEQ ID NO: 12)

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNDYVSWYQQL
 PGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDE
 ANYYCATWDRRPTAYVVFVGGGTKLTVLG

SEQ ID NO: 13: SD15016

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCV ASGMFFGIAAMGWYRQAPGKQRELVANITS
 DFSTNYADSVKDRFTISRDN AENTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADSLGTGWRHYYYYW
 GQGTQVTVSSAAAWSHQPFEKGAAW SHQPFEKGAAW SHQPFEK

SEQ ID NO: 14: SD15004

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RD
 GSTNYADSVKGRFTISRDN AKNLTYLQMNLSLKPEDTAVYLC HVS LYR DPLGVAGGMG
 VYWGK GALVTVSSAAAW SHQPFEKGAAW SHQPFEKGAAW SHQPFEK

SEQ ID NO: 15 - гемагглютинин CAA24269.1 (вирус гриппа А (А/Aichi/2/1968
 (H3N2))) (не включающий сигнальную последовательность)

QDLPGNDNST ATLC LGHNAV PNGTLVKTIT DDQIEVTNAT ELVQSSSTGK 50
 ICNNPHRILD GIDCTLIDAL LGDPHCDVFQ NETWDLFVER SKAFSNCYPY 100
 DVPDYASLRS LVASSGTLEF ITEGFTWTGV TQNGGSNACK RGP GSGFFSR 150
 LNWLTKSGST YPVLNVTMPN NDNFDKLYIW GIHPSTNQE QTSLYVQASG 200
 RVTVSTRRSQ QTIPNIGSR PWVRGLSSRI SIYWTIVKPG DVLVINSNGN 250
 LIAPRGYFKM RTGKSSIMRS DAPI DTCISE CITPNGSIPN DKPFQNVNKI 300

TYGACPKYVK QNTLKLATGM RNVPEKQTRG LFGAIAGFIE NGWEGMIDGW
 350 YGFRHQNSEG TGQAADLKST QAAIDQINGK LNRVIEKTNE KFHQIEKEFS 400
 EVEGRIQDLE KYVEDTKIDL WSYNAELVA LENQHTIDLT DSEMKNLF EK 450
 TRRQLRENAE EMGNCFKIY HKCDNACIES IRNGTYDHDV YRDEALNNRF 500
 QIKGVELKSG YKD WILWISF AISCFLLCVV LLGFIMWACQ RGNIRCNICI 550

SEQ ID NO 16: UFV5367

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGGKYVCSAKLRMVTGL
 RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGI
 TNK VNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
 DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGT YDYPKYSEES

KLNREKIDGVKLESMGVYQI

SEQ ID NO 17: UFV5369

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 135: UFV150553

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCFENKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLESMGVYQI

SEQ ID NO 30: UFV150558

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 31: UFV150559

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCFENKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 32: UFV150565

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLESMGVYQILAIY

SEQ ID NO 33: UFV150566

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLESMGVYQILA

SEQ ID NO 34: UFV150567

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGI

TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLESMGVY

SEQ ID NO 35: UFV150568

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLESMG

SEQ ID NO 36: UFV150569

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLES

SEQ ID NO 37: UFV150570

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKL

SEQ ID NO 38: UFV150571

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGV

SEQ ID NO 39: UFV150572

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKID

SEQ ID NO 40: UFV150573

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENLGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGGGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHHCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREK

SEQ ID NO 41: UFV150574

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DFHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEES
KLNK

SEQ ID NO 42: UFV150575

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIY

SEQ ID NO 43: UFV150576

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQILA

SEQ ID NO 44: UFV150577

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIY

SEQ ID NO 45: UFV150578

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTR

SEQ ID NO 46: UFV150579

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLES

SEQ ID NO 47: UFV150580

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEE

AKLNREEIDGVKL

SEQ ID NO 48: UFV150581

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGV

SEQ ID NO 49: UFV150582

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEID

SEQ ID NO 50: UFV150583

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREE

SEQ ID NO 51: UFV150584

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNR

SEQ ID NO 52: UFV150849

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
EFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEES
KLNREKIDGVKLESMGVYQI

SEQ ID NO 53: UFV150850

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
EYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 54: UFV150552

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGL
RNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGI

TNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DFHDANVKNLKYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEE
SKLNREKIDGVKLESMGVYQI

SEQ ID NO 55: UFV160088

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGL
RNKPSKQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAINGI
TNKVNSVIEKMNTQRTAICKEYPKSEQRMECLEKKVDDIEKKIWCYNAELLVLENQRT
LEFHNDINVKNLKYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEE
SKLNREKIDGVKLESMGVYQI

SEQ ID NO 56: UFV160090

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCIEALEKKVDDIEKKIWCYNAELLVLENQRT
LEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 57: UFV160093

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGKECNKSERCIEALEKKVDDIEKKIWCYNAELLVLENQRT
LEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 58: UFV160097

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
EYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 59: UFV160301

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQRRRKKGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNA
IDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY
SEEAALNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 60: UFV160302

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSRGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
EYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 61: UFV160303

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSRGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 62: UFV160304

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSRGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
EYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO: 63: UFV160360

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 64: UFV160361

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKYVCSTKLRLATGLRNKPS
KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVN
SVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDA
NVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNR
EEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 65: UFV160362

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKKYVCSTKLRLATGLRNKP
SKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKV
NSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHD
ANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLN
REEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 66: UFV160363

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHKYVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITN
KVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDY
HDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAK
LNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 67: UFV160364

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHNKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAK

KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 68: UFV160365

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKYVCSTKLRLATGL
RNLKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDANVKNLKLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 69: UFV160366

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKKYVCSTKLRLATG
LRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDE
ITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRT
LDYHDANVKNLKLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSE
EAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 70: UFV160367

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLYVCSTKLRLAT
GLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAID
EITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQR
TLDYHDANVKNLKLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYS
EEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 71: UFV160368

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLA
TGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAI
DEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLTYHDANVKNLKLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY
SEEAALNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 72: UFV160369

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLGPKYVCSTKLRL
ATGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQN
AIDEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLEN
QRTLDYHDANVKNLKLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPK
YSEEAALNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO: 73: UFV160370

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHGPKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
YHDANVKNLKLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 74: UFV160371

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGEGPKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT

NKVN SVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 75: UFV160372

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDVCSTKLRLATGLRNKPSKQ
SQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVI
EKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDANV
KNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 76: UFV160373

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKVCSTKLRLATGLRNKPSK
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNS
VIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDAN
VKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 77: UFV160374

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHVCSTKLRLATGLRNKPS
KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVN
SVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHDA
NVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 78: UFV160375

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHNVCSSTKLRLATGLRNKPS
KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKV
NSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHD
ANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 79: UFV160376

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHNGVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITN
KVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDY
HDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 80: UFV160377

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKHNGKVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEIT
NKVN SVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 81: UFV160378

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLCVSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 82: UFV160379

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLGVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 83: UFV160380

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSGKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 84: UFV160381

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSKYVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITN
KVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDY
HDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAK
LNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 85: UFV160382

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSGIKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 86: UFV160383

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDAGSGIVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITN
KVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDY
HDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAK
LNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 87: UFV160384

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGSGIKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA

KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 88: UFV160385

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGSGKYVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITN
KVNVSIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDY
HDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEAK
LNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 89: UFV160386

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDHAGAKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVNVSIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 90: UFV160387

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDQEGKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNVSIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 91: UFV160388

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDTPVKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNVSIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 92: UFV160389

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDFPKTKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNVSIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 93: UFV160390

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDEPGDKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEIT
NKVNVSIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLD
YHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEA
KLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 94: UFV160391

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDEPGKYVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITN

KVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DY HDANVKNL
YEKVRSQLKNN
AKEIGNGCFE
FYHKCDNTC
MESVKNGTY
DYPKYSEEAK
LNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 95: UFV160392

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
EDTGNLKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGY
HHQNEQGS
GYAADLKST
QNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIED
KIEEIESKI
WCYNAELLV
LENQRTLD
YHDANVKNL
YEKVRSQLK
NNAKEIGNG
CFEFYHKCD
NTCMESVK
NGTYDYPKY
SEEA
KLNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO: 96: UFV160393

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
EDTPSSKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGY
HHQNEQGS
GYAADLKST
QNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIED
KIEEIESKI
WCYNAELLV
LENQRTLD
YHDANVKNL
YEKVRSQLK
NNAKEIGNG
CFEFYHKCD
NTCMESVK
NGTYDYPKY
SEEA
KLNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 97: UFV160394

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
EDTPSKYVCSTKLRLATGLRN
KPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGY
HHQNEQGS
GYAADLKST
QNAIDEITN
KVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIED
KIEEIESKI
WCYNAELLV
LENQRTL
DY HDANVKNL
YEKVRSQLK
NNAKEIGNG
CFEFYHKCD
NTCMESVK
NGTYDYPKY
SEEAK
LNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 98: UFV160395

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
EDATGNKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGY
HHQNEQGS
GYAADLKST
QNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIED
KIEEIESKI
WCYNAELLV
LENQRTLD
YHDANVKNL
YEKVRSQLK
NNAKEIGNG
CFEFYHKCD
NTCMESVK
NGTYDYPKY
SEEA
KLNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 99: UFV160396

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
EDYPGDKYVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGY
HHQNEQGS
GYAADLKST
QNAIDEIT
NKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIED
KIEEIESKI
WCYNAELLV
LENQRTLD
YHDANVKNL
YEKVRSQLK
NNAKEIGNG
CFEFYHKCD
NTCMESVK
NGTYDYPKY
SEEA
KLNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 100: UFV160397

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
EDYPGDVCSTKLRLATGLR
NKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGY
HHQNEQGS
GYAADLKST
QNAIDEITNK
VNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIED
KIEEIESKI
WCYNAELLV
LENQRTLD
YHDANVKNL
YEKVRSQLK
NNAKEIGNG
CFEFYHKCD
NTCMESVK
NGTYDYPKY
SEEAKL
LNREEIDGV
KLESTRIYQI

SEQ ID NO 101: UFV160503

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSRKRRRGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAI
DEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY
SEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 102: UFV160504

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKQREERRRRKRLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQN
AIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLEN
QRTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPK
YSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 103: UFV160655

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENSKYVCSAKLRMVTGLRNKP
SKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKV
NSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDFHD
ANVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLN
REKIDGVKLESMGVYQI

SEQ ID NO 104: UFV160656

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKP
SKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKV
NSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLDYHD
ANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLN
REEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 105: UFV160657

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLA
TGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAI
DEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSEQCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLDYHDANVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY
SEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 106: UFV160658

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKP
SKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKV
NSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTLEYHD
SNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLN
REEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 107: UFV160659

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLA
TGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAI
DEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLEYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY

SEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO: 108: UFV160663

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGL
RNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEI
TNKVN SVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
AKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 109: UFV160664

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKP
SKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKV
NSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLN
REEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 110: UFV160665

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKKYVCSTKLRLATGLRNKP
SKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKV
NSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQRTL
DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLN
REEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 11: UFV160666

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLA
TGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAI
DEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY
SEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 112: UFV160667

DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLGKYVCSTKLRLA
TGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAI
DEITNKVNSVIEKMNTQPTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKY
SEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQI

SEQ ID NO 138: UFV160655

ATGAAAGTCAAACCTGCTGGTCTGCTGTGCACCTCACCGCCACTTACGCCGA
CACCATCTGTATTGGGTACCACGCTAACAACCTCCACCGACACAGTGGATAACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAACCTGCTGGAGAATTCCAAGTACG
TCTGCAGCGCCAAGCTGAGGATGGTGACAGGCCTGAGAAATAAGCCAGCAAGCAG
TCCCAGGGCCTGTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGAAT
GGTGGACGGATGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGCTCCGGCTATGCCG
CCGATCAGAAGTCTACCCAGAACGCCATCAATGGCATCACAAACAAGGTCAATAGC
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGTC

CGAGCAGTGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCTAAGATCT
GGTGCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTCGAGAATCAGAGGACCCTGGACTTCC
ACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTACGAGAAGGTGAAGTCCCAGCTGAAGAACAAT
GCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCAACGACGAGTG
TATGGAGTCCGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCTAAGTATTCTGAGGAGAGCA
AACTGAATCGGGAAAAAATCGATGGCGTGAAACTGGAATCAATGGGGGTGTATCAG
ATCTAATAA

SEQ ID NO 139: UFV160656

ATGAAGGCCATCCTGGTGGTGTGCTGTACACCTTCGCCACAGCCAACGCCG
ACACCCTGTGCATCGGGTACCACGCCAACAAATCCACCGACACAGTGGATACAGTG
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACACACTCCGTGAACCTGCTGGAGGATAAGAAGTA
CGTCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCAAGCAAGC
AGTCCCAGGGCCTGTTTCGGAGCCATCGCCGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGA
ATGGTGGACGGATGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGATACGC
CGCCGACCTGAAGTCCACCCAGAATGCCATCGACGAGATTACCAACAAGGTCAATA
GCGTGATTGAGAAGATGAACACCCAGCCACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAG
AGCGAGCAGTGTATGAAGCAGATTGAGGATAAGATTGAGGAGATTGAGTCCAAGAT
TTGGTGCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTCGAGAATCAGAGGACCCTGGACTA
CCACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGAGGAGCCAGCTGAAGAACA
ATGCCAAGGAGATTGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCT
GTATGGAGTCTGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATAGCGAGGAGGCC
AAGCTGAATCGGGAGGAAATCGATGGCGTGAACTGGAGAGCACCCGCATCTACCA
GATCTAATAA

SEQ ID NO 140: UFV160664

ATGAAGGCCATCCTGGTGCCTGCTGTACACTTTCGCCACCGCCAACGCTGA
TACCCCTGTGCATCGGGTACCACGCTAACAACTCTACCGACACAGTGGATACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGAAGTACG
TCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCAGCAAGCAG
AGCCAGGGCCTGTTTGGAGCAATTGCAGGCTTTACCGAGGGCGGCTGGACAGGCAT
GGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCTGGATATGCTG
CTGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATTGATGAGATCACAAACAAGGTCAATAGC
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCGGACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGTC
CGAGAGGTGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCTAAGATCT
GGTGCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTCGAGAATCAGCGGACCCTGGACTAC
CACGACAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGCTCCCAGCTGAAGAACAA
TGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCT
GTATGGAGTCTGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATAGCGAGGAGGCC
AAGCTGAATAGGGAGGAAATCGATGGCGTGAACTGGAGTCTACAAGAATCTACCA
GATCTAATAA

SEQ ID NO 141: UFV160665

ATGAAGGCCATCCTGGTCGTCCTGCTGTACACTTTCGCCACCGCCAACGCTGA
TACCCTGTGCATCGGGTACCACGCTAACAACTCTACCGACACAGTGGATACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGAAGTACG
TCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCAGCAAGCAG
AGCCAGGGCCTGTTTGGAGCAATTGCAGGCTTTACCGAGGGCGGCTGGACAGGCAT
GGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCTGGATATGCTG
CTGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATTGATGAGATCACAACAAGGTCAATAGC
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGTC
CGAGAGGTGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCTAAGATCT
GGTGCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTCGAGAATCAGCGGACCCTGGACTAC
CACGACAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGCTCCCAGCTGAAGAACA
TGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCT
GTATGGAGTCTGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATAGCGAGGAGGCC
AAGCTGAATAGGGAGGAAATCGATGGCGTGAAGCTGGAGTCTACAAGAATCTACCA
GATCTAATAA

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

ATGAAGGTCAAACCTGCTGGTCCTGCTGTGCACCTTTACTGCCACCTACGCTGA
CACTATCTGTATCGGGTACCACGCAAACTCAACCGACACAGTGGATACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCCGTGAACCTGCTGGAGAATAGCAAGTACG
TCTGCAGCGCCAAGCTGCGGATGGTGACAGGCCTGAGAAATAAGCCCTCTAAGCAG
AGCCAGGGACTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGAAT
GGTGGACGGATGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGCTATGCCG
CCGATCAGAAGTCCACCAGAACGCCATCAATGGCATCACAACAAGGTGAACAGC
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTATAATAAGAG
CGAGCAGTGTATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCT
GGTGCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTGGAGAATCAGCGCACCCCTGGACTTCC
ACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGAAGAGCCAGCTGAAGAACAAT
GCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCAACGACGAGTG
TATGGAGAGCGTGAAGAATGGCACCTACGATTATCCTAAGTATTCCGAGGAGTCTA
AGCTGAATCGGGAGAAAATCGATGGCGTGAAGCTGGAGTCCATGGGCGTGTACCAG
ATCCTGGCCATCTATTCTACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGCTGCTGGTGAGCCTGGGG
GCTATTTCAATTCTGGATGTGCTCTAACGGCTCTCTCCAGTGTGCGATTTGTATCTGAT
AA

SEQ ID NO 143: UFV171589 (UFV160656+TM)

ATGAAGGCCATTCTGGTCGTCGCTGTACACTTTCGCCACCGCTAACGCTGA
CACCTGTGCATCGGGTACCACGCCAATAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGAGGACAAGAAGTACG
TCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCTCTAAGCAG
AGCCAGGGCCTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGCAT
GGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGATCCGGATATGCCG

CCGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTCAATTCT
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGAG
CGAGCAGTGTATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCT
GGTGCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTGGAGAATCAGAGGACCCTGGACTAC
CACGATGCCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGGTCCCAGCTGAAGAACA
TGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTACCACAAGTGCGACAACACCT
GTATGGAGTCCGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATTCTGAGGAGGCC
AAGCTGAATCGGGAGGAAATCGATGGCGTGAAGCTGGAGTCTACCCGCATCTACCA
GATCCTGGCCATCTATAGCACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGTGGTGGTGTCCCTGGG
GGCTATCTCTTTCTGGATGTGCTCAAATGGGTCCCTCCAGTGTGCGATCTGTATCTGA
TAA

SEQ ID NO 144: UFV171590 (UFV160664+TM)

ATGAAGGCCATTCTGGTCTGTGCTGTACACTTTCGCCACCGCTAACGCTGA
CACCTGTGCATCGGGTACCACGCCAATAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGAGGACAAGAAGTACG
TCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCTCTAAGCAG
AGCCAGGGCCTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGCAT
GGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGATCCGGATATGCCG
CCGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTCAATTCT
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGAGGACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGA
GCGAGAGGTGTATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGAT
CTGGTGTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTGGAGAATCAGAGGACCCTGGACT
ACCACGATAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGGTCCCAGCTGAAGAAC
AATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTACCACAAGTGCGACAACAC
CTGTATGGAGTCCGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATTCTGAGGAGG
CCAAGCTGAATCGGGAGGAAATCGATGGCGTGAAGCTGGAGTCTACCCGCATCTAC
CAGATCCTGGCCATCTATAGCACAGTGGCCAGCTCCCTGGTGTGGTGGTGTCCCTG
GGGGCTATCTCTTTCTGGATGTGCTCAAATGGGTCCCTCCAGTGTGCGATCTGTATCT
GATAA

SEQ ID NO 145: UFV171591 (UFV160665+TM)

ATGAAGGCCATTCTGGTCTGTGCTGTACACTTTCGCCACCGCTAACGCTGA
CACCTGTGCATCGGGTACCACGCCAATAACTCCACCGACACAGTGGATACCGTGCT
GGAGAAGAACGTGACCGTGACACACTCTGTGAATCTGCTGGAGGACAAGAAGTACG
TCTGCAGCACCAAGCTGAGGCTGGCCACAGGCCTGAGAAACAAGCCCTCTAAGCAG
AGCCAGGGCCTGTTTCGGAGCAATCGCAGGCTTTACCGAGGGAGGATGGACAGGCAT
GGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGATCCGGATATGCCG
CCGACCTGAAGTCTACCCAGAATGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTCAATTCT
GTGATCGAGAAGATGAACACCCAGCCTACAGCCATCGGCTGCGAGTACAATAAGAG
CGAGAGGTGTATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGATCT
GGTGCTATAACGCCGAGCTGCTGGTGCTGCTGGAGAATCAGAGGACCCTGGACTAC

CACGATAGCAACGTGAAGAATCTGTATGAGAAGGTGCGGTCCCAGCTGAAGAACAA
TGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTTCGAGTTTTACCACAAGTGCGACAACACCT
GTATGGAGTCCGTGAAGAATGGCACATACGATTATCCCAAGTATTCTGAGGAGGCC
AAGCTGAATCGGGAGGAAATCGATGGCGTGAAGCTGGAGTCTACCCGCATCTACCA
GATCCTGGCCATCTATAGCACAGTGGCCAGTCCCTGGTGTGGTGGTGTCCCTGGG
GGCTATCTCTTCTGGATGTGCTCAAATGGGTCCCTCCAGTGTGCGATCTGTATCTGA
TAA

SEQ ID NO: 146: БЕЛОК MD3606

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSFDR
GSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAGGMG
VYWGK GALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGW
FRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNKNTLEYLEMNLSLKPEDTAVYY
CTAQQQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
GSLRLS CAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN
ENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI
NTDGGTYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQ
GTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

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

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDCK
YVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYA
ADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYN
AELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVK
NGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQIHIIIIIIII

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

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDCK
YVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYA
ADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSEKCMKQIEDKIEEIESKIWCYN
AELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESV
KNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLESTRIYQIHIIIIIIII

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

MKANLLVLLCALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDCK
KYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSY
AADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQRTAIGCEYNKSEKCMKQIEDKIEEIESKIWCY
NAELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESV
RNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQIHIIIIIIII

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

MEKTVLLLATVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILERTKY
VCSNRLVATGLRNKPQKESQGLFGAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGGYA
ADKESTQKAIDGVTNKVNSIINKMNTQREAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKVWCY
NAELLVLMENQRTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNKELGNGCFEFYHKCDNECMES
VKNGTYDYPQYSEEARLNREEISGVKLESMGTYQIHNNNNN

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

MEKIVLLFAIVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKKKYV
CSNRLVATGLRNKPQKESQGLFGAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGGYAA
DKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQREAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKVWCYN
AELLVLMENQRTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNKELGNGCFEFYHKCDNECMESV
RNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGYQIHNNNNN

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

MAIYLLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDILERNVTVTHAKDILEKTKYVCS
EKLVLATGLRNKPQKESQGLFGAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGGYAADK
ESTQKAFDGIITNKVNSVIEKMNTQREAIGCEYSKSERCMKQIEDKIEEIESKVWCYNAEL
LVLMENQRTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNVRELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKN
GTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSMVGYYQIHNNNNN

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

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDCK
YVCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHNNQNEQSGGYA
ADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQRTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYN
AELLVLENQRTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVK
NGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSN
GSLQCRICI

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа А группы 1, содержащий домены HA1 и HA2, причем указанный полипептид стеблевого домена HA содержит аминокислотную последовательность, которая включает:

- (i) делецию головной области в домене HA1;
- (ii) модификацию тримеризационной области в домене HA2;
- (iii) по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих внутримonomерный дисульфидный мостик;
- (iv) по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующих межмономерный дисульфидный мостик;

где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392, представляет собой P, R или Y, и аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 434, представляет собой Q, и где нумерация аминокислотных положений основана на нумерации H3 аминокислотных положений на основании SEQ ID NO: 15.

2. Полипептид по п.1, где указанные полипептиды стеблевого домена содержат аминокислотную последовательность, которая включает:

(i) делецию головной области в домене HA1, причем указанная делеция охватывает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 53, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 302, включительно;

(ii) модификацию тримеризационной области в домене HA2, предпочтительно модификацию тримеризационной области в С-спирали, причем указанная тримеризационная область содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 405, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 419, включительно;

(iii) цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, и цистеин в положении, соответствующем положению 422;

(iv) цистеин в положении, соответствующем положению 397, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 405; или цистеин в положении, соответствующем положению 396, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408; или цистеин в положении, соответствующем положению 399, в комбинации с цистеином в положении 405;

где аминокислота в положении, соответствующем положению 392, представляет собой P, R или Y, предпочтительно P или R, и где аминокислота в положении, соответствующем положению 434, представляет собой Q.

3. Полипептид по п.1 или 2, где делеция в домене HA1 охватывает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включи-

тельно.

4. Полипептид по пп.1, 2 или 3, где модификация тримеризационного домена включает введение гетерологичного тримеризационного домена в С-спираль.

5. Полипептид по п.4, где гетерологичный тримеризационный домен представляет собой последовательность GCN₄.

6. Полипептид по пп.1, 2 или 3, где модификация тримеризационного домена включает оптимизацию последовательности гептадного повтора в С-спирали.

7. Полипептид по любому из пп.1-6, где аминокислота, соответствующая аминокислоте 392, представляет собой Y, P или R, и аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 434, представляет собой Q, и аминокислота в положении, соответствующем положению 442, представляет собой A.

8. Полипептид по любому из пп.1-7, содержащий цистеин в положении, соответствующем положению 397, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 405.

9. Полипептид по любому из пп.1-8, где:
аминокислота в положении, соответствующем положению 395, представляет собой I;
аминокислота в положении, соответствующем положению 399, представляет собой Y или C, предпочтительно Y;

аминокислота в положении, соответствующем положению 400, представляет собой P;

аминокислота в положении, соответствующем положению 401, представляет собой K;

аминокислота в положении, соответствующем положению 402, представляет собой S; и/или

аминокислота в положении, соответствующем положению 404, представляет собой R или Q.

10. Полипептид по любому из пп.1-9, где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 323, представляет собой K и/или аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 326, представляет собой K.

11. Полипептид по любому из пп.1-10, где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 339, представляет собой T.

12. Полипептид по любому из пп.1-11, где полипептид не содержит участок расщепления протеазой.

13. Полипептид по п.12, где аминокислота в положении 329 не является аргинином (R), где предпочтительно аминокислота в положении 329 представляет собой глутамин (Q).

14. Полипептид по любому из пп.1-11, где полипептид содержит природный участок расщепления или многоосновный участок расщепления.

15. Полипептид по любому из пп.1-14, где полипептид содержит сигнальную последовательность (часть сигнальной последовательности).

16. Полипептид по любому из пп.1-15, содержащий усеченный домен HA2.

17. Полипептид по п.16, где полипептид не содержит трансмембранный и цитоплазматический домены.

18. Полипептид по любому из пп.1-17, где, по меньшей мере, С-концевая часть домена HA2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 516, подвергнута делеции.

19. Полипептид по любому из пп.1-18, где подвергнутый делеции участок домена HA1 замещен линкерной последовательностью из 1-10 аминокислот.

20. Полипептид по любому из пп.1-19, где аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392, представляет собой P или R.

21. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-20.

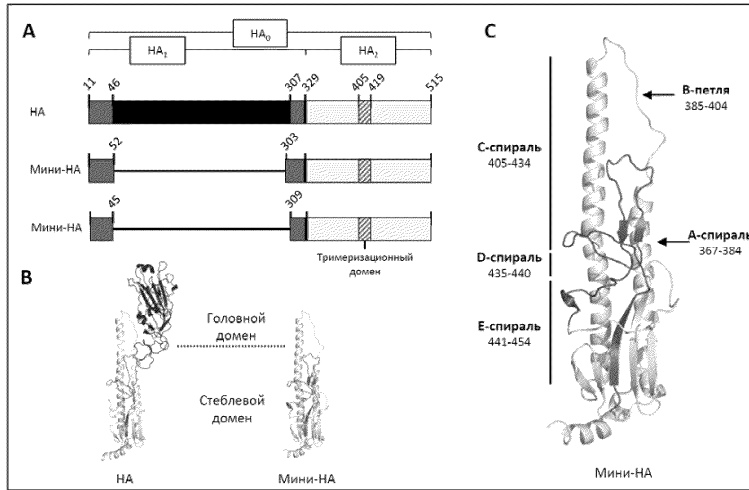
22. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид стеблевого домена HA группы 1 по любому из пп.1-20.

23. Вектор по п.22, где вектор представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор.

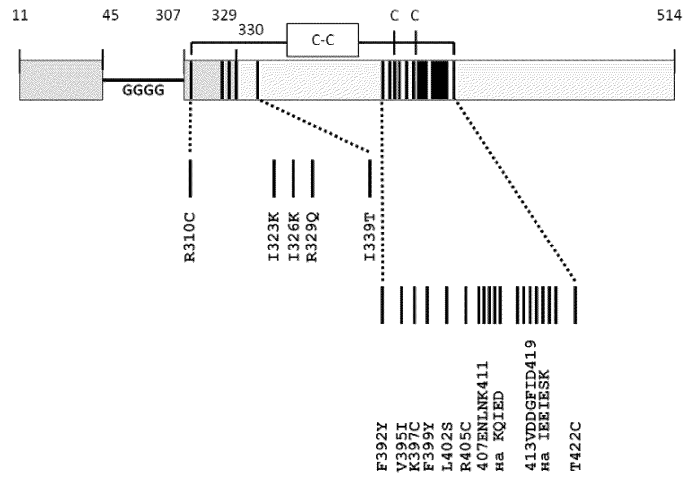
24. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-20, и/или нуклеиновую кислоту по п.21, и/или вектор по п.22 или 23 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Применение полипептида по любому из пп.1-20, нуклеиновой кислоты по п.21 и/или вектора по п.22 или 23 для индукции иммунного ответа на вирус гриппа.

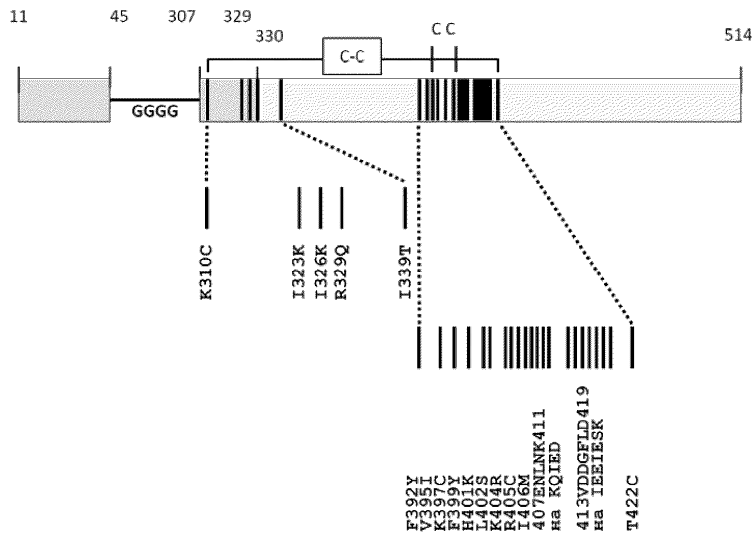
26. Применение полипептида по любому из пп.1-20, и/или нуклеиновой кислоты по п.21, и/или вектора по п.22 или 23 в качестве вакцины.



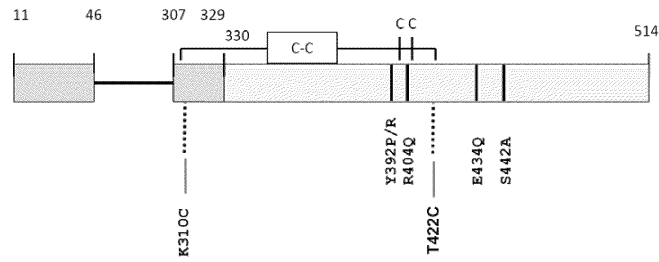
Фиг. 1



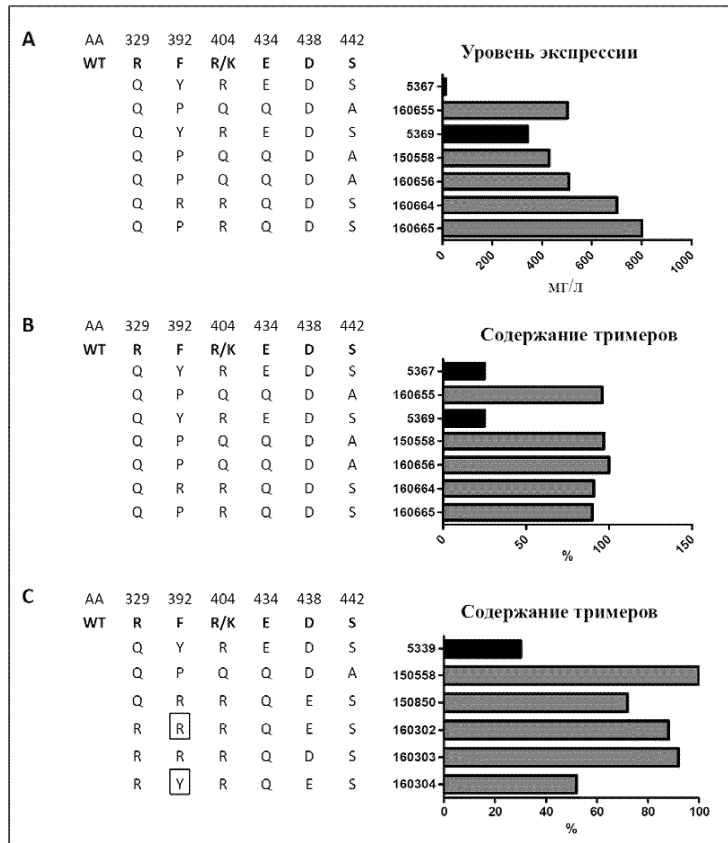
Фиг. 2



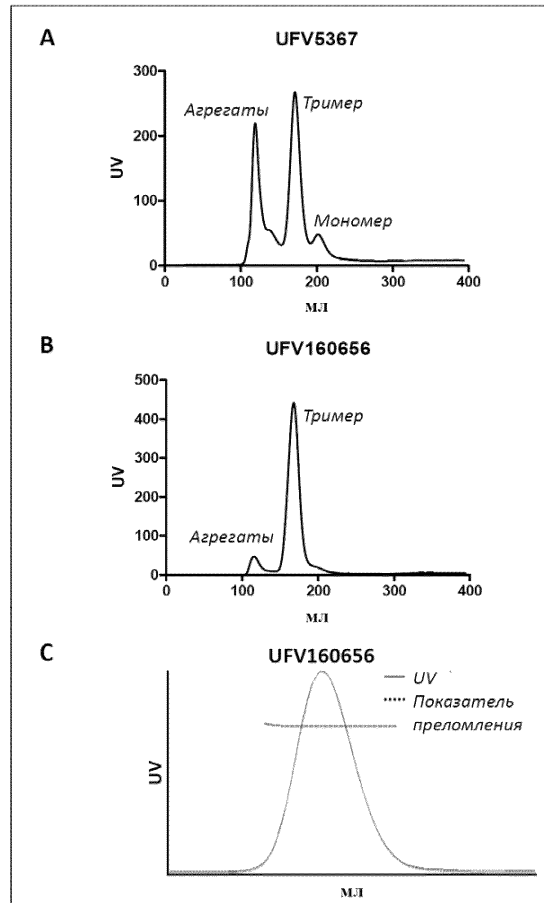
Фиг. 3



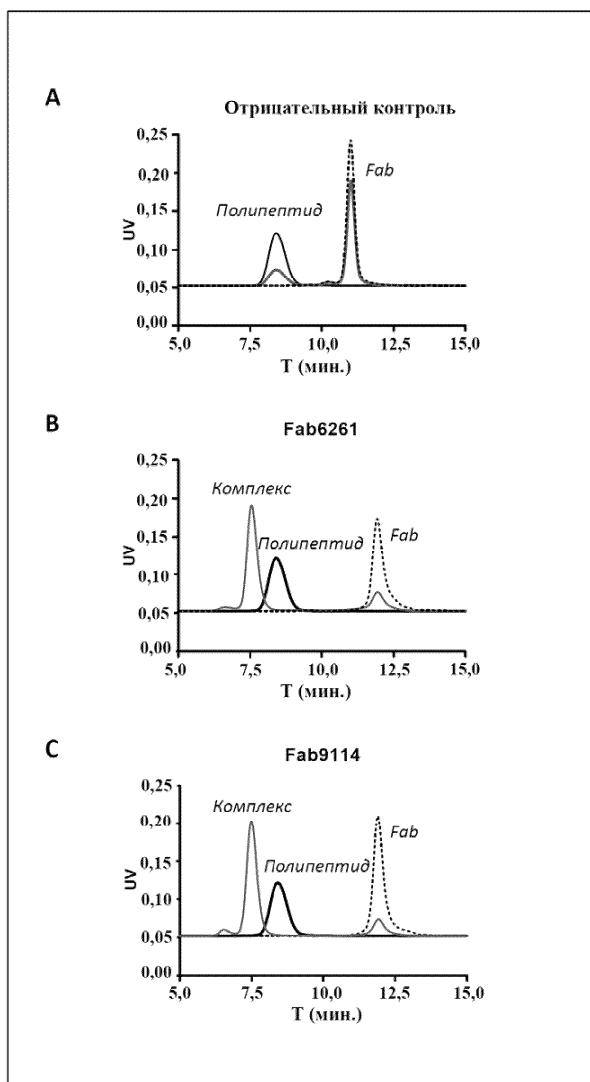
Фиг. 4



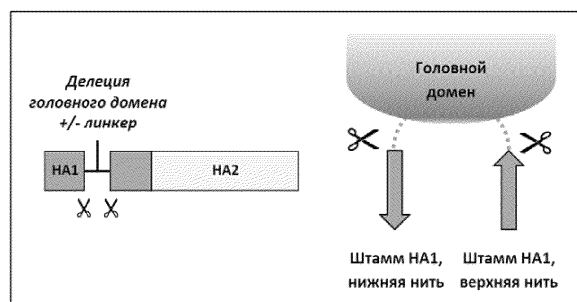
Фиг. 5



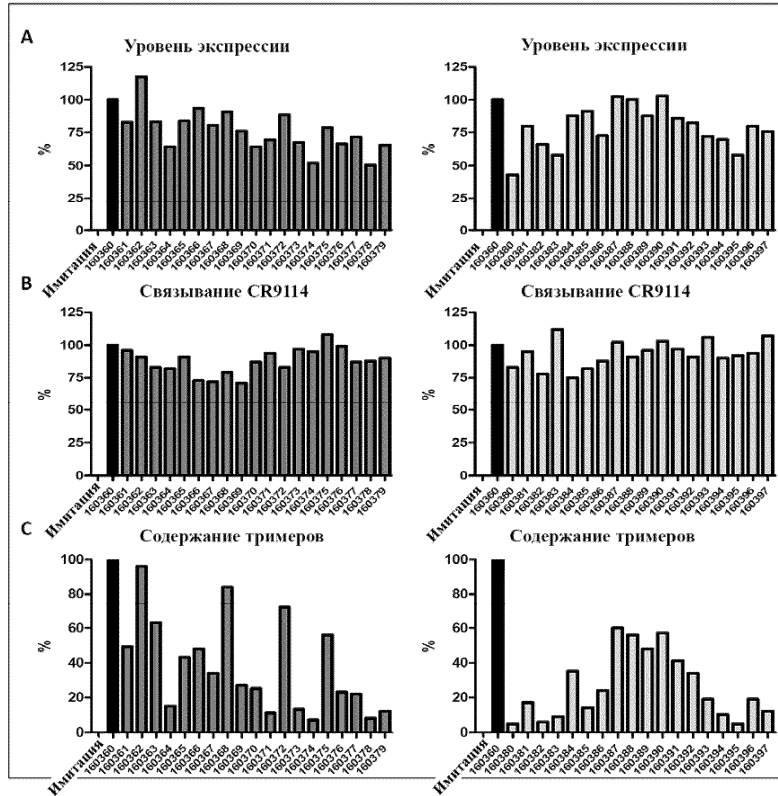
Фиг. 6



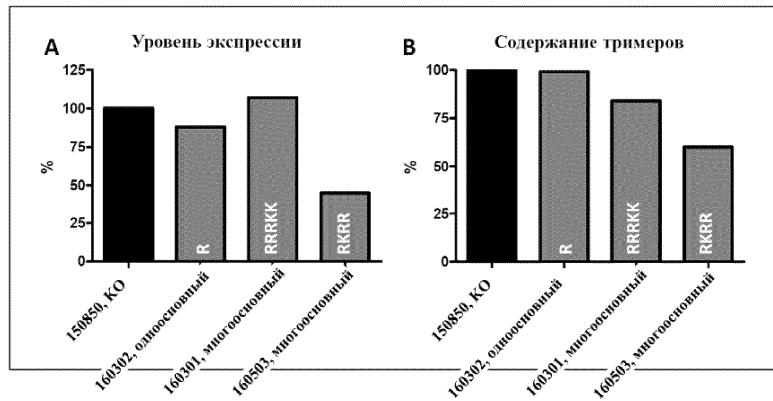
Фиг. 7



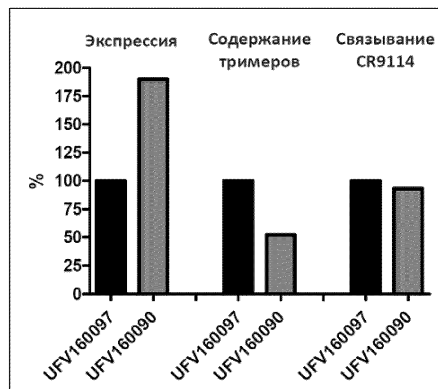
Фиг. 8



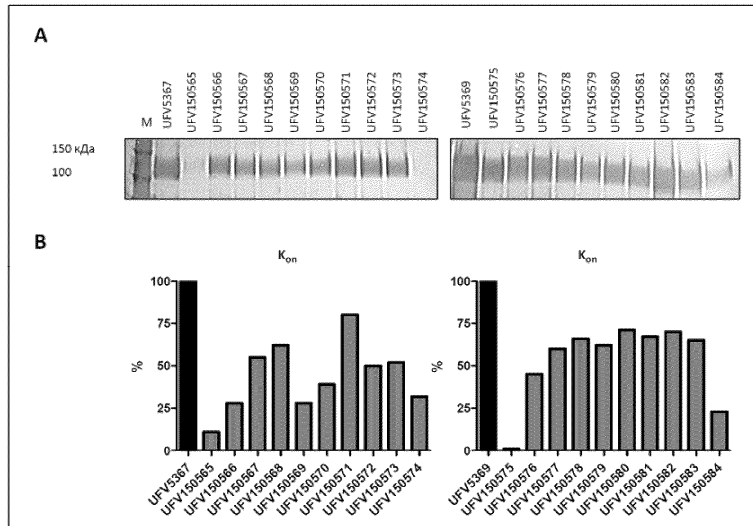
Фиг. 9



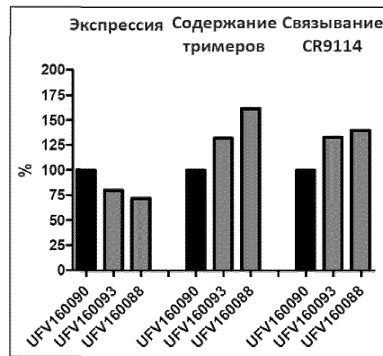
Фиг. 10



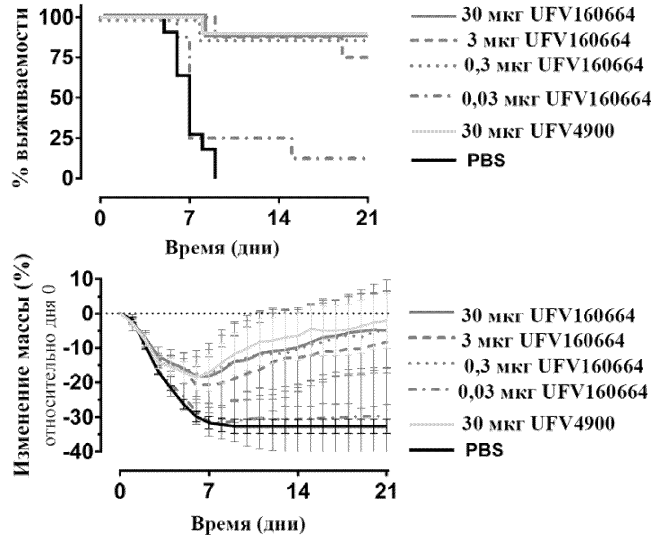
Фиг. 11



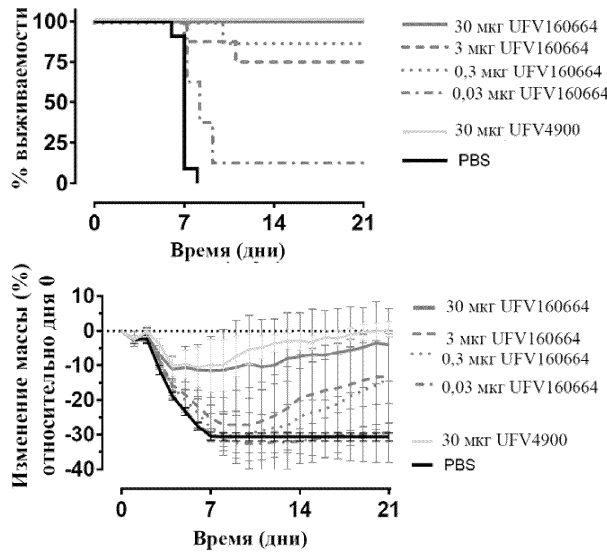
Фиг. 12



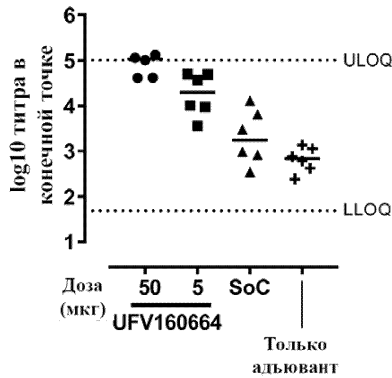
Фиг. 13



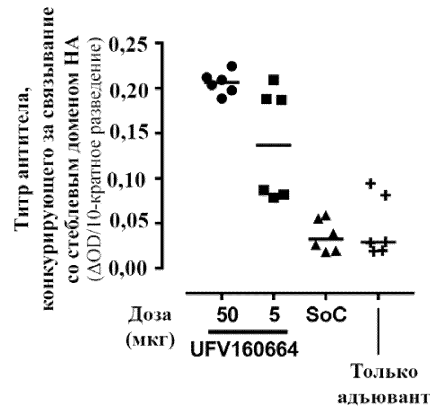
Фиг. 16



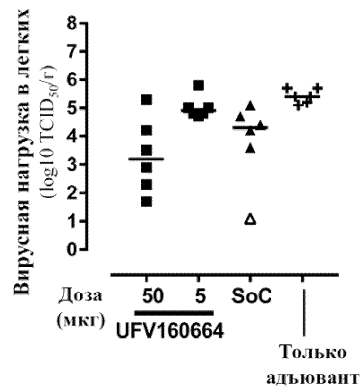
Фиг. 17



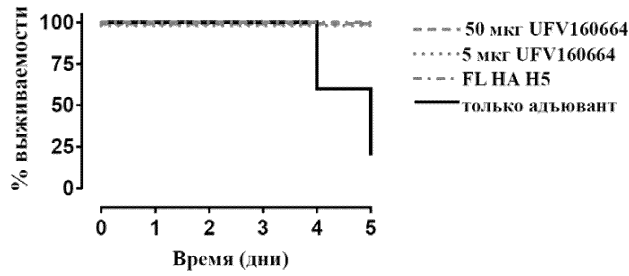
Фиг. 18



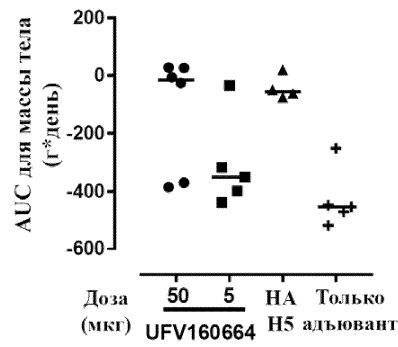
Фиг. 19



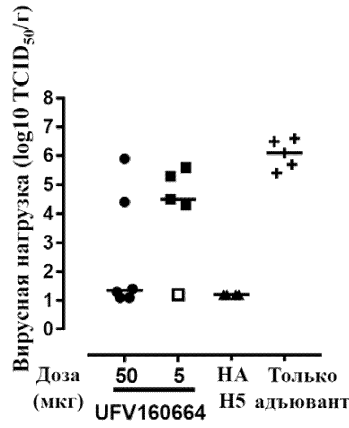
Фиг. 20



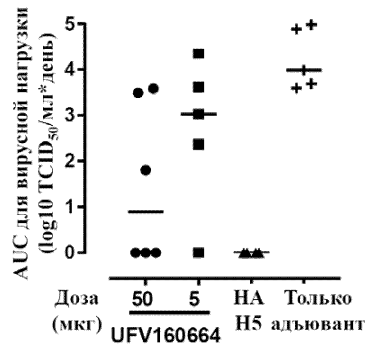
Фиг. 21



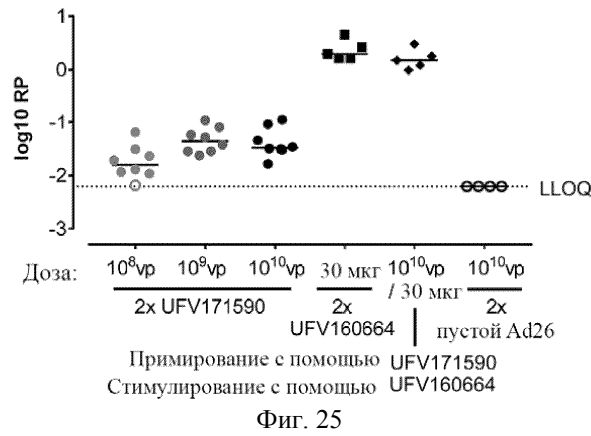
Фиг. 22



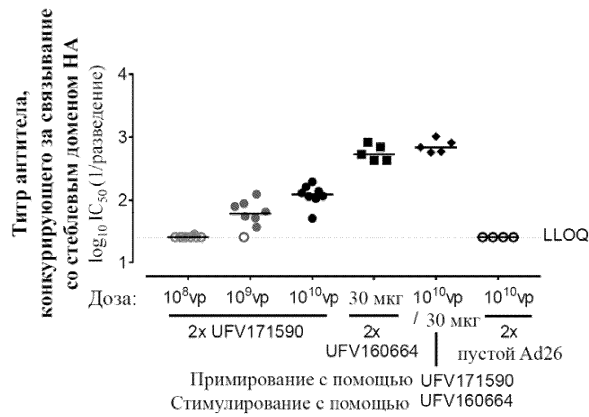
Фиг. 23



Фиг. 24

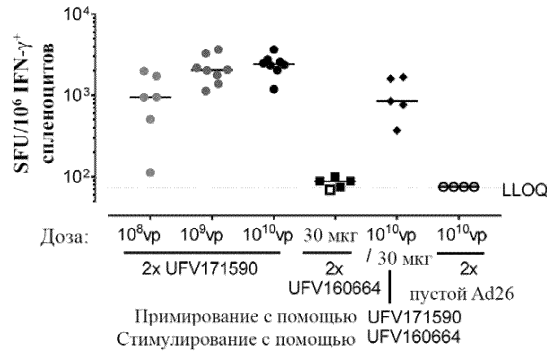


Фиг. 25



Фиг. 26

045051

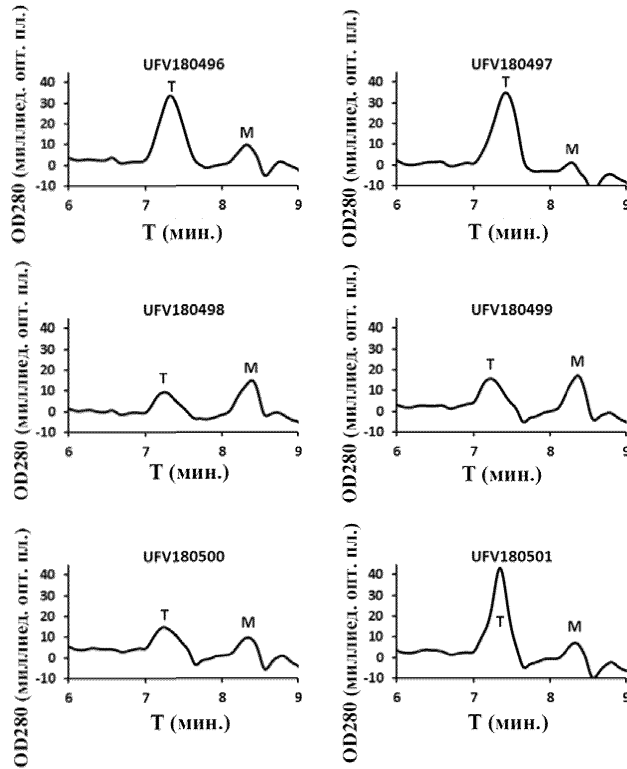


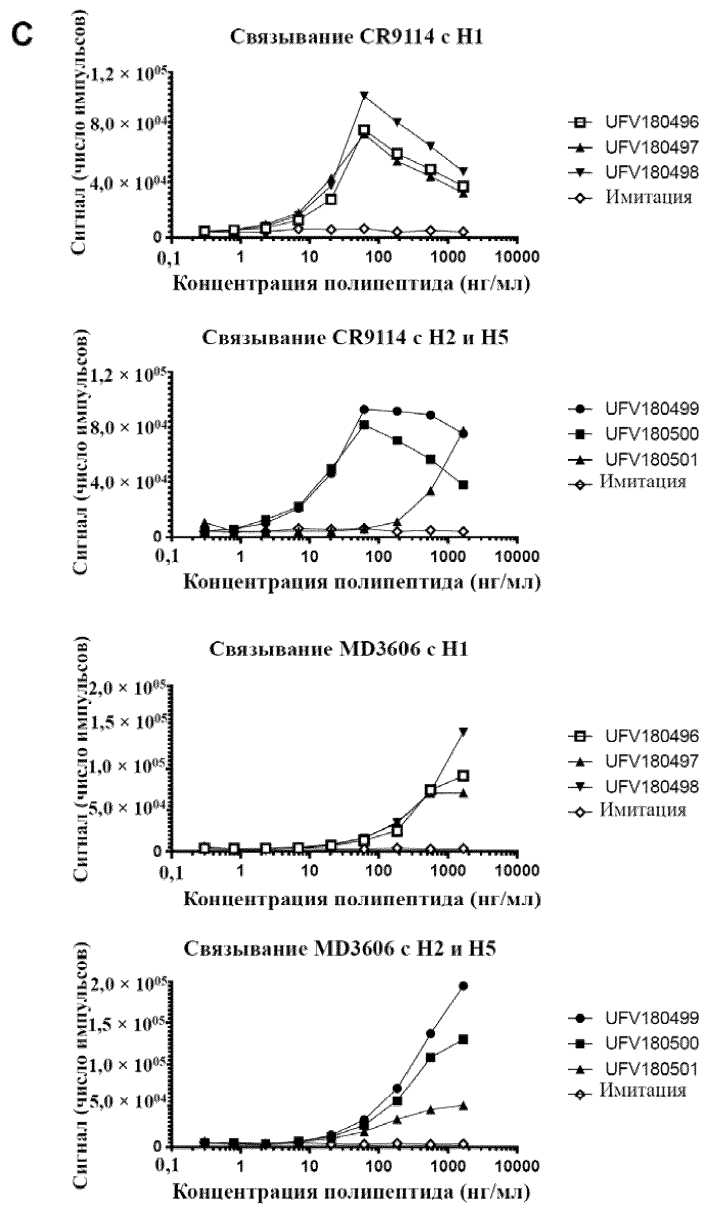
Фиг. 27

A

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

B





Фиг. 28



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2