

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047998**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.14

(21) Номер заявки
202192921

(22) Дата подачи заявки
2020.04.23

(51) Int. Cl. **C07K 14/11** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА**

(31) **62/838,690**

(32) **2019.04.25**

(33) **US**

(43) **2022.02.03**

(86) **PCT/EP2020/061335**

(87) **WO 2020/216844 2020.10.29**

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

(72) Изобретатель:
**Бранденбург Буррис, Ричель
Тина, Милдер Фердинанд Якобус,
Йонгенеелен Манди Антония
Катарина, Кинг Индиго, Сун Ифань,
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) **WO-A1-2013079473
WO-A1-2011056802**

**EILI Y. KLEIN ET AL.: "STABILITY OF
THE INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ
PROTEIN CORRELATES WITH EVOLUTIONARY
DYNAMICS", MSPHERE, vol. 3, no. 1,
1 February 2018 (2018-02-01), XP055720089,
DOI: 10.1128/mSphereDirect.00554-17, the whole
document**

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантным полипептидам гемагглютинина (HA) вируса гриппа А, содержащим домены HA1 и HA2 из HA вируса гриппа А и содержащим аминокислотную последовательность, где (a) аминокислота в положении 355 представляет собой W, и (b) аминокислота в положении 432 представляет собой I, и/или аминокислота в положении 380 представляет собой I, и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида HA представлена согласно нумерации аминокислот в аминокислотной последовательности HA из эталонного штамма вируса гриппа H3N2, в частности эталонного штамма H3N2 A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 1), их иммуногенным фрагментам, молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим указанные полипептиды или иммуногенные фрагменты, и их применениям.

B1

047998

047998

B1

Настоящее изобретение было выполнено, по меньшей мере частично, при государственной поддержке в соответствии с соглашением HNSO100201700018С, выданным ННС. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Введение

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

Уровень техники

Вирусы гриппа являются основными патогенами человека, вызывающими респираторное заболевание (обычно называемое "гриппом"), тяжесть которого варьируется 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, представители всех трех включаются 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. В дополнение к этому, возможность пандемии, вызванной высоковирулентным штаммом вируса, происходящим из животных-резервуаров и реассортированным с повышением распространения от человека к человеку, представляет собой значительную и реальную угрозу для глобального здравоохранения.

Вирусы гриппа А широко распространены в природе и могут инфицировать множество птиц и млекопитающих. Вирусы гриппа представляют собой оболочечные РНК-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 (НА) и нейраминидаза (NA). Вирусы классифицируются на основании различий в антигенной структуре белков НА и NA, при этом их различные комбинации представляют уникальные подтипы вируса, которые дополнительно классифицируются 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 продемонстрировал, что гемагглютинины подразделяются на две основные группы: среди прочего, на подтипы H1, H2, H5 и H9 в филогенетической группе 1, и, среди прочего, на подтипы H3, H4 и H7 в филогенетической группе 2.

Штаммы вируса гриппа типа В являются исключительно человеческими. Антигенная изменчивость НА 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 (НА). Гемагглютинин представляет собой тримерный гликопротеин, который заякорен в вирусной оболочке и имеет двойную функцию: он отвечает за связывание с рецепторами клеточной поверхности, содержащими сиаловую кислоту, а после поглощения он опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембран, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитозоль клетки. НА содержит так называемый головной домен и стеблевой домен. Прикрепление к вирусной мембране опосредуется С-концевой якорной последовательностью (также известной как трансмембранный домен), соединенной со стеблевым доменом. Белок подвергается посттрансляционному расщеплению в определенной петле с получением двух полипептидов - НА1 и НА2 (полная последовательность называется НА0). Дистальный по отношению к мембране головной домен происходит в основном из НА1, а проксимальный по отношению к мембране стеблевой домен - главным образом из НА2 (фиг. 1).

Поскольку вирус гриппа распространен повсеместно, избежать заражения этим вирусом практически невозможно. Вакцинация играет решающую роль в контроле эпидемий и пандемий гриппа. Многие вакцины против гриппа получают посредством способов, которые предусматривают реассортацию, адаптацию и выращивание вирусов в куриных яйцах. Однако у таких существующих способов есть ряд ограничений. Не все штаммы вируса гриппа хорошо растут в яйцах и должны быть адаптированы или представлять собой сконструированные реассортанты вируса. Изменения в НА в ходе получения могут при-

вести к появлению штаммов, которые отличаются от циркулирующих штаммов и могут обеспечивать субоптимальные уровни защиты. Другой недостаток заключается в том, что люди с аллергией на яйца могут проявлять гиперчувствительность к остаточным яичным белкам в вакцинах, полученных с применением яиц. Кроме того, в основе способов с применением яиц лежит бесперебойная поставка яиц, которая может подвергаться перебоям в поставке, например в случае заболевания домашней птицы. Существует потребность в получении вакцин с применением способов, которые не основаны на поставке яиц и при которых получение вакцинного белка контролируется более строго, чем в способах с применением яиц. Рекомбинантные формы НА (гНА), получаемые в культурах клеток, используются в качестве альтернативного источника антигена для вакцин против гриппа по сравнению с антигеном из яиц. Однако при использовании данных способов были обнаружены проблемы, связанные с поддержанием иммуногенности и регулярной четвертичной структуры гНА, а также с обеспечением высоких выходов тримерного гНА. Таким образом, все еще существует потребность в альтернативных способах поставки антигенов для вакцин против гриппа или для диагностических средств, которые позволят разрешить существующие недостатки.

Краткое описание изобретения

Ниже кратко описаны некоторые аспекты настоящего изобретения. Дополнительные аспекты описаны в разделах "Подробное описание изобретения", "Примеры", "Графические материалы" и "Формула изобретения" настоящего патента.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным полипептидам гемагглютина (НА) вируса гриппа А, содержащим домены НА1 и НА2 НА вируса гриппа А и содержащим аминокислотную последовательность, где:

(a) аминокислота в положении 355 представляет собой триптофан (W), и

(b) аминокислота в положении 432 представляет собой изолейцин (I), и/или аминокислота в положении 380 представляет собой I,

и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида НА представлена согласно нумерации аминокислот в аминокислотной последовательности НА из эталонного штамма вируса гриппа H3N2, в частности эталонного штамма H3N2 A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 1).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к мультимерным полипептидам, содержащим по меньшей мере два полипептида НА, в частности к тримерным полипептидам, содержащим три полипептида НА, описанных в данном документе.

В соответствии с настоящим изобретением было продемонстрировано, что можно получить высокие уровни рекомбинантных полипептидов НА вируса гриппа, в частности рекомбинантных тримерных полипептидов НА, и они характеризуются повышенной температурой плавления, что указывает на большую стабильность по сравнению с полипептидами НА дикого типа без добавления гетерологичных аминокислотных последовательностей, таких как гетерологичные тримеризационные домены. Кроме того, полипептиды НА по настоящему изобретению правильно свернуты, как продемонстрировано посредством связывания антител к НА с полипептидами НА, таких как без ограничения антитела CR9114, CR8020 и/или CR6261. Таким образом, полипептиды способны индуцировать иммунный ответ на НА при введении субъекту, в частности субъекту-человеку. Тримерные полипептиды характеризуются четвертичной структурой нативного НА дикого типа и, таким образом, представляют иммунной системе природные эпитопы, в том числе консервативные эпитопы проксимального по отношению к мембране стебля молекулы НА.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантные полипептиды НА вируса гриппа.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает векторы, в частности рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды НА вируса гриппа.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает иммуногенные композиции, содержащие полипептид НА вируса гриппа, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает полипептиды НА вируса гриппа, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные полипептиды НА 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 гриппозного заболевания, в частности заболевания или состояния, вызванного штаммом вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и/или 2.

Настоящее изобретение также предусматривает способы индукции иммунного ответа на НА вируса гриппа у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту полипептида НА вируса гриппа, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением. В еще одном дополнительном аспекте предусмотрены способы предупреждения гриппозного заболевания и/или вакцинации против гриппозного заболевания, включающие введение полипептида или им-

муногенной композиции, описанных выше, нуждающемуся в этом лицу, такому как лицо, идентифицированное как подверженное риску инфицирования гриппозным заболеванием.

В еще одном дополнительном аспекте предусмотрен способ получения рекомбинантного полипептида НА, определенного выше, включающий экспрессию описанной выше молекулы нуклеиновой кислоты в прокариотической или эукариотической клетке, такой как клетка млекопитающего, например клетка СНО или клетка насекомого, необязательно дополнительно включающий очистку/выделение гНА из указанной клетки.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает применение полипептидов НА в качестве инструментов для исследования или диагностических инструментов или в качестве мишеней для получения средств, подавляющих вирус гриппа, представляющих собой антитела.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. А. Трехмерное изображение мономера полипептида по настоящему изобретению с указанными положениями мутаций. Головка гемагглютинина (НА) показана темно-серым цветом, стебель показан светло-серым цветом; В. Схематическое изображение мономера полипептида (черный: головка; светло-серый: стебель) по настоящему изобретению с указанными положениями мутаций.

Фиг. 2. А. Филогенетическое древо НА вируса гриппа. Указаны различные подтипы группы 1 и группы 2 вируса гриппа А и вируса гриппа В. Уровни экспрессии белка, определенные с помощью ОСТЕТ (сенсор на основе антител к His2). В последнем столбце показано кратное повышение уровня экспрессии стабилизированных растворимых тримеров НА по настоящему изобретению по сравнению с НА дикого типа (WT); С. Профили эксклюзионной хроматографии (SEC): пунктирными линиями представлены НА WT, а сплошной черной линией представлены стабилизированные полипептиды НА в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 3. А. Результаты SEC-анализа очищенных тримерных (Т) полипептидов по настоящему изобретению (черная линия) и полипептидов WT с тримеризационным доменом сборки (серая линия) (следует отметить, что UFV4239 не содержит домен сборки). Очищенные полипептиды сборки WT характеризуются увеличением ширины пика и образованием мультимеров (*) после хранения при -80°C . По причине отсутствия тримеризационного домена в UFV4239 был экспрессирован и очищен только мономер (М); В и С. Результаты анализа в отношении температурной стабильности очищенных полипептидов посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF, значения T_{m50} в $^{\circ}\text{C}$); D. Связывание моноклональных антител (mAb) CR6261, CR8020, CT149, CR9114 и мультидоменного антитела MD3606 (ELISA, значения EC_{50}).

Фиг. 4. А. Уровни экспрессии белка, определенные с помощью ОСТЕТ (сенсор на основе антитела к His2); В. Результаты SEC-анализа надосадочной жидкости культуры клеток EXPI-293. UFV181007 содержит мутации K380I и E432I (пунктирная черная линия). UFV181005 содержит мутации H355W и M478I (пунктирная серая линия). Комбинация стабилизирующих мутаций (UFV1810009, черная линия).

Фиг. 5. А. Уровни экспрессии белка, определенные с помощью ОСТЕТ (сенсор на основе антител к His2). В последнем столбце показано кратное повышение уровня экспрессии стабилизированных растворимых тримеров НА по настоящему изобретению по сравнению с НА дикого типа (WT); В. Профили эксклюзионной хроматографии (SEC): пунктирными линиями представлены НА WT, а сплошными черными линиями представлены дополнительные стабилизированные полипептиды НА в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 6. Профили эксклюзионной хроматографии (SEC) очищенного стабилизированного НА до и после температурного стресса. Показаны профили полипептидов до эксперимента (пунктирные линии) и после 60-дневной инкубации при 4°C (сплошные черные линии) и 37°C (сплошные серые линии).

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 специфическими свойствами, например цистеин, который способен образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими остатками цистеина, пролин, который образует цикл с полипептидным остовом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В табл. 3 показаны сокращения и свойства стандартных аминокислот.

Полагают, что после термина "включенный" или "включающий", используемого в данном документе, 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 классифицируются 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 (H) и нейраминидазы (N). В соответствии с настоящим изобретением подтипы вируса гриппа могут быть названы по их номеру H, как, например, "вирус гриппа, содержащий HA подтипа H3", "вирус гриппа подтипа H3" или "вирус гриппа H3", или по комбинации номера H и номера N, как, например, "подтип H3N2 вируса гриппа" или "H3N2". 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 HA и NA, приведенным в скобках, например A/Moscow/10/2000 (H3N2). 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, что гемагглютинины подразделяются на две основные группы: среди прочего, на подтипы H1, H2, H5 и H9 в филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1"), и, среди прочего, на подтипы H3, H4, H7 и H10 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 у субъекта вируса гриппа, например вируса гриппа А или В. 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 полинуклеотидов, таких как молекулы ДНК (например, кДНК или геномная ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК), а также аналоги ДНК и РНК, полученные с применением аналогов нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может быть однонитевой или двухнитевой. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы химически или биохимически или могут содержать неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, как будет без труда понятно специалистам в данной области техники. 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.п.), заряженные связи (например, фосфоротиоатные, фосфородитиоатные и т.п.), подвешенные фрагменты (например, полипептиды), интеркаляторы (например, акридин, псорален и т.п.), хелатирующие вещества, алкилирующие вещества и модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.п.). 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, гибридационных зондов и праймеров для ПЦР.

Используемая в данном документе нумерация аминокислот в HA основана на нумерации H3, описанной в Winter et al. (Nature 292: 72-75, 1981). Таким образом, нумерация аминокислотных остатков или аминокислотных положений в полипептидах по настоящему изобретению соответствует нумерации аминокислот в H3 HA (в частности, нумерации аминокислотных положений в HA из A/Aichi/2/68), как описано и показано на фиг. 2 в Winter et al. (1981)). Нумерация, в частности, соответствует нумерации аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. Например, фраза "аминокислота в положении 355" относится к аминокислотному остатку, который находится в положении 355 в соответствии с нумерацией H3 по Winter et al. (1981), т.е. к аминокислотному остатку, который находится в положении 355 в SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области техники будет понятно, что посредством выравнивания последовательностей можно определить эквивалентные аминокислоты в других штаммах и/или подтипах вируса гриппа, например, HA H1, H5 или H7. Таким образом, следует отметить, и специалист в данной области техники поймет, что разные последовательности HA могут характеризоваться разными системами нумерации, например, если добавлены или удалены дополнительные аминокислотные остатки по сравнению с SEQ ID NO: 1. Таким образом, следует понимать, что если конкретные аминокислотные остатки упомянуты

под своим номером, описание не ограничивается только аминокислотами, расположенными точно в этом пронумерованном положении при подсчете от начала данной аминокислотной последовательности, а скорее подразумевается эквивалентный/соответствующий аминокислотный остаток во всех возможных последовательностях НА, даже если этот остаток не находится в точно таком же пронумерованном положении, например, если последовательность НА короче или длиннее, чем SEQ ID NO: 1, или характеризуется вставками или делециями по сравнению с SEQ ID NO: 1. Специалист в данной области техники сможет легко определить, каково соответствующее/эквивалентное аминокислотное положение для любого из конкретных пронумерованных остатков, указанных в данном документе, например посредством выравнивания данной последовательности НА с SEQ ID NO: 1. Таким образом, в вариантах осуществления, в которых упомянуты конкретные аминокислотные остатки белка НА вируса гриппа, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается последовательностями, содержащими указанный аминокислотный остаток (например, наличие триптофана (W) в положении 355 и/или изолейцина (I) в положении 432 и/или 380) только в точно таких же пронумерованных аминокислотных положениях.

"Полипептид" относится к полимеру из аминокислот, соединенных амидными связями, как известно специалистам в данной области техники. 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, посредством посттрансляционного процессинга, такого как отщепление сигнального пептида, образование дисульфидных связей, гликозилирование (например, N-связанное и O-связанное гликозилирование), расщепление протеазами и модификация липидами (например, S-пальмитоилирование).

Используемый в данном документе термин "дикий тип" относится к НА из вирусов гриппа, которые циркулируют в природе.

Подробное описание изобретения

Вирусы гриппа оказывают значительное влияние на глобальное здравоохранение населения, вызывая миллионы случаев тяжелой болезни каждый год, тысячи смертей и значительные экономические потери. Существующие тривалентные 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. Кроме того, выбор соответствующих вакцинных штаммов представляет много сложностей и часто приводит к субоптимальной защите. Более того, прогнозирование подтипа следующего пандемического вируса, в том числе того, когда и где он появится, в настоящее время невозможно.

Гемагглютинин (НА) является основным гликопротеином оболочки вирусов гриппа А, 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 опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембран с высвобождением вирусного генома в цитоплазму клетки-мишени.

НА представляет собой тримерный белок, содержащий эктодомен из приблизительно 500 аминокислот на мономер, и содержит три идентичные субъединицы (мономеры), каждая из которых содержит два полипептида, НА1 и НА2, связанных дисульфидной связью. Каждый мономер первоначально экспрессируется как НА0 и впоследствии расщепляется протеазами хозяина на домены НА1 и НА2, которые связаны указанной дисульфидной связью.

Большая часть N-концевого домена (домена НА1, приблизительно 320-330 аминокислот в длину) образует дистальный по отношению к мембране глобулярный домен (головной домен), который содержит рецепторсвязывающий сайт и большинство эпитопов, распознаваемых антителами, нейтрализующими вирус. Меньший C-концевой домен (домен НА2, ~ 180 аминокислот в длину) образует стеблевидную структуру (стеблевой домен), которая заякоривает глобулярный домен на клеточной или вирусной мембране. Одна из наиболее консервативных областей представляет собой последовательность вблизи сайта расщепления, в частности 23 N-концевые аминокислоты НА2 (слитый пептид), которые являются консервативными среди всех подтипов вируса гриппа А. Часть этой области экспонирована в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице НА (НА0), но становится недоступной после расщепления НА0 на НА1 и НА2.

Как указано выше, белок НА вируса гриппа является основным белком, встречающимся на поверхности вируса. НА, встречающийся на поверхности вириона, находится в тримерной форме. Тример заякорен в вирусной мембране трансмембранными последовательностями на карбоксиконце каждого из трех мономеров. Основная защитная эффективность вакцин против гриппа связана с антителами к гемагглютинуину, направленными на белок НА. Это подчеркивает важность индукции иммунного ответа на конформационно релевантные белки НА.

Для получения растворимых полипептидов, характеризующихся наличием эктодомена гемагглюти-

нина вируса гриппа А (НА0), НА необходимо экспрессировать без его нативного трансмембранного и цитоплазматического домена. Экспрессия стабильного тримерного растворимого НА дикого типа (WT) часто очень низкая в клетках млекопитающих. Для улучшения по меньшей мере уровня тримеризации часто гетерологичный тримеризационный домен (например, тримеризационный домен сборки; Stevens et al. Science 303(5665):1866-1870, 2004) подвергается слиянию с С-концом полипептида посредством методов генетической инженерии. К сожалению, добавление гетерологичного тримеризационного домена вводит нежелательный неопитоп и часто снижает уровень экспрессии или может изменить четвертичную структуру полипептида.

Настоящее изобретение предусматривает стабильные рекомбинантные полипептиды гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А, содержащие домены НА1 и НА2 из НА вируса гриппа А и содержащие аминокислотную последовательность, где:

(a) аминокислота в положении 355 представляет собой W, и

(b) аминокислота в положении 432 представляет собой I, и/или аминокислота в положении 380 представляет собой I,

и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида НА представлена согласно нумерации аминокислот в аминокислотной последовательности НА из эталонного штамма вируса гриппа H3N2, в частности эталонного штамма H3N2 A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 1).

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что стабильные рекомбинантные полипептиды НА, в частности растворимые тримерные полипептиды НА, можно получить без добавления домена сборки или любых других гетерологичных тримеризационных доменов при наличии конкретных аминокислотных мутаций в остоле полипептида НА.

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные полипептиды гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А, содержащие домены НА1 и НА2 НА вируса гриппа А и содержащие аминокислотную последовательность, где:

(a) аминокислота в положении 355 подвергнута мутации по типу замены на W, и

(b) аминокислота в положении 432 подвергнута мутации по типу замены на I, и/или аминокислота в положении 380 подвергнута мутации по типу замены на I,

и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида НА представлена согласно нумерации аминокислот в аминокислотной последовательности НА из эталонного штамма вируса гриппа H3N2, в частности эталонного штамма H3N2 A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 1). Поскольку мутации являются "скрытыми" мутациями, т.е. боковые цепи этих остатков не экспонированы на поверхности белка, антигенность полипептидов НА не изменится.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию по типу замены аминокислоты в положении 355, в частности гистидина (H), на триптофан (W), и мутацию по типу замены аминокислот в положениях 432 и/или 380 на изолейцин (I).

Полипептиды НА по настоящему изобретению, содержащие аминокислотный остаток W в положении 355, например в результате введения мутации по типу замены аминокислоты в положении 355, в частности H, на W; в комбинации с аминокислотой I в положении 432, например в результате введения мутации по типу замены аминокислоты в положении 432 на I, или содержащие комбинацию I в положении 432 и I в положении 380, например в результате введения мутации по типу замены в положениях 432 и 380 на I, характеризуются повышенным уровнем экспрессии в клетках млекопитающих, повышенной склонностью к тримеризации (например, по результатам измерения посредством AlphaLISA, Octet и SEC) и/или повышенным уровнем термостабильности (например, по результатам измерения посредством динамической сканирующей флуориметрии/калориметрии (DSF/DSC)) по сравнению с полипептидами НА без данных аминокислотных мутаций. Кроме того, сила связывания всех протестированных антител с полипептидами по настоящему изобретению составляет менее 5 нМ (по результатам измерения посредством Octet и ELISA). Это ясно демонстрирует, что полипептиды структурно эквивалентны (в том, что касается первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры) нативному НА дикого типа. Кроме того, новые полипептиды НА не нуждаются в присутствии каких-либо искусственных (гетерологичных) последовательностей, таких как линкерные последовательности, последовательности-метки или последовательности тримеризационного домена.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию по типу замены аминокислоты в положении 355, в частности гистидина (H), на триптофан (W), и мутацию по типу замены аминокислот в положениях 432 и/или 380 на изолейцин (I).

В определенных вариантах осуществления полипептиды НА содержат аминокислотную последовательность, где:

(a) аминокислота в положении 388 представляет собой M, и/или

(b) аминокислота в положении 478 представляет собой I.

Было показано, что эти мутации, по меньшей мере в определенных подтипах НА, дополнительно повышают стабильность полипептидов НА.

В определенных вариантах осуществления указанные мономеры НА не содержат сайта расщепле-

ния протеазой. Как описано выше, расщепление белка HA0 вируса гриппа (на HA1 и HA2) необходимо 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 сайт расщепления протеазой. Таким образом, известно, что последовательность Arg (R) - Gly (G), охватывающая HA1 и HA2 (т.е. аминокислотные положения 329 и 330), представляет собой сайт распознавания для трипсина и трипсин-подобных протеаз и, как правило, расщепляется для активации гемагглютинаина (фиг. 1A). В определенных вариантах осуществления сайт расщепления протеазой был удален посредством мутации по типу замены аминокислотного остатка в положении 329 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 по типу замены аминокислоты в положении 329 на глутамин (Q). Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат нокаут-мутацию R329Q в сайте расщепления для предотвращения предполагаемого расщепления молекулы в ходе или после получения *in vitro* или *in vivo* после введения. Нокаут-мутация в сайте расщепления, например мутация R329Q, таким образом обеспечивает нечувствительность к конформационным изменениям, вызываемым низким pH, и сохраняет конформацию HA до слияния.

В соответствии с настоящим изобретением домен HA1 и/или HA2 может содержать полный (т.е. полноразмерный) домен HA1 и/или HA2 полипептида HA вируса гриппа, или они могут содержать по меньшей мере часть домена HA1 и/или HA2.

Для получения секретлируемых (растворимых) полипептидов HA в определенных вариантах осуществления мономеры HA содержат усеченный домен HA2. Таким образом, в определенных вариантах осуществления мономеры HA в полипептидах по настоящему изобретению не содержат трансмембранный и цитоплазматический домен. В частности, в определенных вариантах осуществления мономеры полипептида содержат домен HA2, который является усеченным на С-конце. Таким образом, усеченный домен HA2 по настоящему изобретению короче, чем полноразмерная последовательность HA2, за счет делеции одного или нескольких аминокислотных остатков на С-конце и/или N-конце домена HA2. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно предусматривает рекомбинантные полипептиды HA, содержащие внеклеточный домен HA (эктодомен, ECD) или состоящие из него.

В определенных вариантах осуществления была удалена С-концевая часть домена HA2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 515, таким образом был удален практически полный трансмембранный и цитоплазматический домен.

В определенных вариантах осуществления также были подвергнуты делеции одна или несколько аминокислот на С-конце эктодомена. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что даже при делеции большей части домена HA2 можно получить стабильные растворимые и тримерные полипептиды HA. Таким образом, в определенных вариантах осуществления была удалена С-концевая часть домена HA2, начинающаяся с аминокислотной последовательности в положении 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, или 514 (согласно нумерации H3, описанной в Winter et al., выше), с получением растворимого полипептида после экспрессии в клетках.

Аналогично, домен HA1 может быть полным (т.е. полноразмерным доменом HA1) или по меньшей мере его частью. В определенном варианте осуществления полипептиды содержат усеченный домен HA1. Домен HA1 может быть усеченным на N- и/или С-конце домена HA1.

В определенных вариантах осуществления полипептиды HA 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 направляются на секреторный путь. 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 HA вируса гриппа сигнальные последовательности обычно содержат первые 16 аминокислот аминокислотной последовательности полноразмерного HA0 (соответствующие аминокислотам от положения -6 до положения 10 согласно нумерации H3).

Настоящее изобретение также предусматривает иммуногенные фрагменты полипептидов HA. В определенных вариантах осуществления может быть подвергнута делеции по меньшей мере часть домена HA1, составляющего головной домен, с получением иммуногенных фрагментов полипептидов HA по настоящему изобретению, таких как полипептиды HA без головного домена (т.е. полипептиды только со стеблем).

Полипептиды по настоящему изобретению представляют собой гемагглютинин (HA) (получены из него) вирусов гриппа А. Как описано выше, вирус гриппа А содержит несколько подтипов HA, которые можно разделить на две основные группы: группу 1 и группу 2 (фиг. 2A). Стабилизирующие мутации в полипептидах по настоящему изобретению могут быть применимы ко всем типам гемагглютининов ви-

руса гриппа А.

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 происходят из вируса гриппа А группы 1 или группы 2. В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 происходят из одного и того же вируса группы 1 или группы 2. В определенных других вариантах осуществления домены HA1 и HA2 происходят из разных вирусов группы 1 или из разных вирусов группы 2, или домены HA1 и HA2 происходят из вирусов гриппа А из разных групп, например домен HA2 происходит из вируса группы 1, а домен HA1 происходит из вируса группы 2 или наоборот. В определенных вариантах осуществления головной домен (т.е. по меньшей мере часть домена HA1, образующая головной домен, происходит из другого вируса гриппа, нежели стеблевой домен (т.е. часть домена HA2, образующая стеблевой домен полипептида HA вируса гриппа).

В определенных конкретных вариантах осуществления домены HA1 и/или HA2 происходят из вируса гриппа А, выбранного из группы, состоящей из вируса гриппа, содержащего HA подтипа H1, например из вируса гриппа A/California/07/2009 или A/Michigan/45/2015; вируса гриппа, содержащего HA подтипа H2, например из вируса гриппа A/Env/MPU3156/2005; вируса гриппа, содержащего HA подтипа H5, например из вируса гриппа A/Eurasian Wigeon/MPF461/2007; вируса гриппа, содержащего HA подтипа H9, например из вируса гриппа A/Hong Kong/1073/1999; вируса гриппа, содержащего HA подтипа H3, например из вируса гриппа H/Hong Kong/1/1968 или A/Panama/2007/1999; вируса гриппа, содержащего HA подтипа H14, например из вируса гриппа A/Mallard/Astrakhan/263/1982; вируса гриппа, содержащего HA подтипа H7, например из вируса гриппа A/Mallard/Netherlands/12/2000, и вируса гриппа, содержащего HA подтипа H10, например из вируса гриппа A/Chicken/Germany/N/1949. Специалисту в данной области техники будет понятно, что полипептиды по настоящему изобретению также могут быть получены из HA других штаммов вируса гриппа А из либо группы 1, либо группы 2.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления, в зависимости от подтипа HA (т.е. группы 1 или группы 2) полипептиды HA или их иммуногенные фрагменты связываются со связывающей молекулой CR9114, CR6261, CR8020 и/или MD3606. Таким образом, предусмотрены новые полипептиды HA, которые характеризуются наличием специфических эпитопов для антитела CR6261 (содержащего вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 3), и/или антитела CR9114 (содержащего вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 6 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 7), и/или антитела CR8020 (содержащего вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 4 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 5), и/или мультидоменного антитела MD3606 (SEQ ID NO: 8). Полипептиды по настоящему изобретению можно использовать для выработки антител, нейтрализующих вирус гриппа, при введении *in vivo* по отдельности или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения.

В определенных вариантах осуществления полипептиды HA по настоящему изобретению или их иммуногенные фрагменты связаны с наночастицами, такими как, например, полимеры, липосомы, вирусоподобные частицы или самособирающиеся наночастицы. Полипептиды могут быть объединены с наночастицами, инкапсулированы в них или конъюгированы с ними (например, ковалентно связаны с ними или адсорбированы на них).

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает мультимерные полипептиды, содержащие по меньшей мере два полипептида HA или их иммуногенных фрагмента, описанных выше.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления мультимерные полипептиды являются тримерными и содержат три полипептида HA или их иммуногенных фрагмента, описанных выше.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает стабилизированные рекомбинантные стабилизированные тримерные полипептиды гемагглютинина (HA) вируса гриппа А или их иммуногенные фрагменты, при этом указанные полипептиды содержат три мономера HA, каждый из указанных мономеров HA содержит домен HA1 и домен HA2 HA вируса гриппа А и содержит аминокислотную последовательность, где:

(a) аминокислота в положении 355 представляет собой W, и

(b) аминокислота в положении 432 представляет собой I, или аминокислота в положении 432 представляет собой I, и аминокислота в положении 380 представляет собой I;

и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида HA представлена согласно нумерации аминокислот в аминокислотной последовательности HA из эталонного штамма вируса гриппа H3N2, в частности эталонного штамма H3N2 A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 1).

Как указано выше, в соответствии с настоящим изобретением было показано, что как уровни экспрессии, так и тримеризацию стабильных тримеров HA можно повысить за счет наличия аминокислотного остатка W в положении 355, например посредством введения мутации по типу замены аминокислоты в положении 355 на W; в комбинации с аминокислотой I в положении 432, например посредством введения мутации по типу замены аминокислоты в положении 432 на I; или наличия комбинации I в положении 432 и I в положении 380, например посредством введения мутации по типу замены в положении 432 и 380 на I. Таким образом, полипептиды по настоящему изобретению характеризуются повышенным

уровнем экспрессии в клетках млекопитающих, повышенной склонностью к тримеризации (например, по результатам измерения посредством AlphaLISA, Octet и SEC) и/или повышенным уровнем термостабильности (например, по результатам измерения посредством динамической сканирующей флуориметрии/калориметрии (DSF/DSC)) по сравнению с полипептидами HA без данных аминокислотных мутаций.

В конкретном варианте осуществления полипептиды HA по настоящему изобретению являются стабильными в течение по меньшей мере 3 дней при 40°C.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды HA вируса гриппа или их иммуногенные фрагменты по настоящему изобретению. Специалисту в данной области техники 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 техники могут с применением стандартных методик осуществлять нуклеотидные замены, которые не влияют на полипептидную последовательность, кодируемую описанными полинуклеотидами, для отражения частоты применения 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 HA вируса гриппа или их иммуногенные фрагменты, являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, таких как клетки человека. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378).

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы получения рекомбинантного полипептида HA или его иммуногенного фрагмента, определенных выше, включающие экспрессию описанной выше молекулы нуклеиновой кислоты в прокариотических (например, *E. coli*) или эукариотических клетках (например, клетках млекопитающих, таких как CHO или PER.C6), при этом указанный способ необязательно включает стадию очистки/выделения рекомбинантного полипептида HA или его иммуногенного фрагмента из указанных клеток. Рекомбинантные полипептиды HA вируса гриппа или их иммуногенные фрагменты можно получить согласно любой методике, которую специалист считает подходящей для получения рекомбинантных полипептидов, включая методики, описанные в данном документе. Таким образом, полипептиды по настоящему изобретению можно синтезировать в виде последовательностей ДНК посредством стандартных способов, известных из уровня техники, и клонировать, а затем экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с применением подходящих ферментов рестрикции и способов, известных из уровня техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды HA по настоящему изобретению или их иммуногенные фрагменты, можно синтезировать и/или клонировать и экспрессировать согласно методикам, хорошо известным специалистам в данной области техники. См., например, Sambrook, et al, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Применение технологии рекомбинантной ДНК для получения вакцин против гриппа предлагает несколько преимуществ. К ним относятся возможность избежать стадий адаптации и пассирования инфекционных вирусов в яйцах и получение большего количества высокоочищенного белка в безопасных и более строго контролируемых условиях. Более того, нет необходимости во включении стадии инактивации вируса. Для рекомбинантного получения полипептидов HA по настоящему изобретению можно использовать любую подходящую систему клонирования и экспрессии.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды или их иммуногенные фрагменты получают в клетках млекопитающих. В определенных вариантах осуществления полипептиды гликозилируются при экспрессии в подходящих клетках (например, клетках млекопитающих). Таким образом, полипептиды могут содержать один или несколько нативных и/или введенных (т.е. ненативных) мотивов гликозилирования.

Последовательности гемагглютинина можно получить посредством стандартных рекомбинантных способов, известных из уровня техники, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или ПЦР с применением обратной транскриптазы, обратная инженерия, или можно синтезировать ДНК. В случае ПЦР можно получить праймеры с применением нуклеотидных последовательностей гемагглютинина, которые доступны в общедоступных базах данных. Полинуклеотидные конструкции можно собрать из ПЦР-кассет и последовательно клонировать в вектор, содержащий селективируемый маркер, для репликации в клетке-хозяине. Затем рекомбинантный вектор можно ввести в клетку-хозяина посредством инъекции, трансфекции или электропорации или посредством других способов (например, трансфекции с применением фосфата кальция, опосредованной DEAE-декстраном трансфекции, опосредованной катионными липидами трансфекции, электропорации). Также доступны коммерческие реагенты для трансфекции, такие как липофектамин (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния).

Полипептиды HA или их иммуногенные фрагменты можно извлечь и выделить/очистить из рекомбинантных культур клеток посредством способов, известных из уровня техники, включая анионообменную и/или катионообменную хроматографию, аффинную хроматографию. Для анализа фракций белка,

элюированных посредством данных методик разделения/очистки, можно использовать такие методики, как SDS-PAGE. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники и не будут подробно представлены в данном документе. Очищенные полипептиды также можно анализировать посредством 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-слои. ELISA, AlphaLISA, биослойную интерферометрию (Octet) и FACS и т.п. можно использовать 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 применением электрофореза в геле с SDS в невозстанавливающих условиях, эксклюзионной хроматографии в присутствии Fab-фрагментов антител из нейтрализующих антител широкого спектра действия, таких как CR6261 и/или CR9114, а также AlphaLISA с применением 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 посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные полипептиды HA вируса гриппа, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей HA вируса гриппа, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52 или любых их вариантов или фрагментов, которые характеризуются по меньшей мере приблизительно 40% или 50% или 60% или 65% или 70% или 75% или 80% или 85% или 90% или 95% или 98% или 99% идентичностью с такими аминокислотными последовательностями, или содержат их или состоят из них, где полипептиды HA вируса гриппа содержат триптофан (W) в положении 355 и изолейцин (I) в положении 432 и/или 380, где нумерация аминокислот основана на последовательности под SEQ ID NO: 1, или в аминокислотных положениях, которые соответствуют таким аминокислотным положениям, например, как определено посредством выравнивания аминокислотной последовательности HA с SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные полипептиды HA вируса гриппа, которые получены из аминокислотных остатков 18-518 из SEQ ID NO: 10, аминокислотных остатков 18-518 из SEQ ID NO: 12, аминокислотных остатков 16-514 из SEQ ID NO: 14, аминокислотных остатков 17-516 из SEQ ID NO: 16, аминокислотных остатков 19-512 из SEQ ID NO: 18, аминокислотных остатков 17-521 из SEQ ID NO: 20, аминокислотных остатков 17-521 из SEQ ID NO: 22, аминокислотных остатков 18-523 из SEQ ID NO: 24, аминокислотных остатков 19-515 из SEQ ID NO: 26, аминокислотных остатков 17-515 из SEQ ID NO: 28, аминокислотных остатков 17-521 из SEQ ID NO: 33, аминокислот 18-518 из SEQ ID NO: 34, аминокислот 18-518 из SEQ ID NO: 35, аминокислот 18-517 из SEQ ID NO: 36, аминокислот 18-518 из SEQ ID NO: 38, аминокислот 17-521 из SEQ ID NO: 40, аминокислот 17-521 из SEQ ID NO: 42, аминокислот 17-521 из SEQ ID NO: 44, аминокислот 17-519 из SEQ ID NO: 47, аминокислот 17-521 из SEQ ID NO: 50, аминокислот 19-515 из SEQ ID NO: 51 или аминокислот 17-514 из SEQ ID NO: 52, или содержат их или состоят из них.

В определенных вариантах осуществления полипептиды HA содержат аминокислотную последовательность, полученную из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, или содержащую их или состоящую из них.

Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид HA по настоящему изобретению или его иммуногенный фрагмент.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид HA или его иммуногенный фрагмент в соответствии с настоящим изобретением. Рекомбинантные аденовирусные векторы могут кодировать связанный с мембраной HA и, таким образом, кодировать полипептиды HA, содержащие домен HA2, содержащий трансмембранный и цитоплазматический домены. Аденовектор также может кодировать растворимые полипептиды и, таким образом, кодировать полипептиды HA, содержащие усеченный домен HA2.

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 содержит 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 более 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.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает иммуногенные композиции, содержащие полипептид НА, его иммуногенный фрагмент, нуклеиновую кислоту и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество полипептидов, иммуногенных фрагментов, 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 применяемых дозах и концентрациях не будет вызывать нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым он вводится. 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 среденосителю, с которыми вводятся 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.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полипептидам НА, иммуногенным фрагментам, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описанным в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Настоящее изобретение относится, в частности, к полипептидам НА, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описанным в данном документе, для применения для индукции иммунного ответа, предпочтительно включающего индукцию продуцирования нейтрализующих антител против вируса гриппа, в частности против молекулы НА вируса гриппа. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам НА, иммуногенному фрагменту, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описанным в данном документе, для применения в качестве вакцины против гриппа.

Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа, в частности к способам индукции продуцирования антител против вируса гриппа А у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение указанному субъекту полипептида НА, иммуногенного фрагмента, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описанных выше. Субъект в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является млекопитающим, которое может быть инфицировано вирусом гриппа или может иным образом получить пользу от индукции иммунного ответа на вирус гриппа, при этом такой субъект, например, является грызуном, например, мышью, хорьком, или домашним или сельскохозяйственным животным, или приматом, отличным от человека, или человеком. Предпочтительно субъектом является субъект-человек, такой как лицо, идентифицированное как подверженное риску инфицирования гриппозным заболеванием.

В определенных вариантах осуществления полипептиды НА, иммуногенные фрагменты, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы по настоящему изобретению вводятся в комбинации с адьювантом. Адьювант можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения полипептидов, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов по настоящему изобретению. Примеры подходящих адьювантов 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 сапонинов, 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, продуцируемые бактериями или микроорганизмами, примерами которых являются монофосфориллипид 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. Кроме того, можно использовать известные иммуностимулирующие технологии, такие как слияние полипептидов по настоящему изобретению с белками, известными из уровня техники как усиливающие иммунный ответ (например, столбнячный анатоксин, CRM197, rСТВ, бактериальные флагеллины или другие), или включение полипептидов в виросомы, или их комбинации. Также можно использовать генетические адъюванты, которые совместно доставляются или кодируются, например, одним и тем же аденовектором.

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

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения и/или лечения, предпочтительно предупреждения заболевания, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества полипептида НА, иммуногенного фрагмента, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описанных в данном документе.

Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, иммуногенного фрагмента, нуклеиновой кислоты и/или вектора, которое является эффективным для предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания или состояния, обусловленного инфицированием вирусом гриппа. Предупреждение охватывает подавление или снижение распространения вируса гриппа или подавление или ослабление начала проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфицированием вирусом гриппа. Термин "облегчение", используемый в данном документе, может относиться к снижению проявления видимых или ощутимых симптомов заболевания, виремии или любого другого поддающегося измерению проявления 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, иммуногенные фрагменты, нуклеиновые кислоты и/или векторы по настоящему изобретению, таким образом, можно вводить субъекту, ранее не проходившему лечение, т.е. субъекту, у которого отсутствует заболевание, вызываемое 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 проходили лечение противовирусным соединением, но у которых наблюдался неудовлетворительный противовирусный ответ.

Полипептиды, иммуногенные фрагменты, 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 терапевтические средства, которые облегчают дыхание или способствуют ему.

Полипептиды НА по настоящему изобретению или их фрагменты также можно использовать в качестве инструментов для исследования, в качестве диагностических инструментов или в качестве мишеней для получения реагентов на основе антител или терапевтических антител. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептиды НА могут быть применимы в качестве аналитов для анализа и/или измерения степени связывания и/или титров антител к НА, например, в ELISA-анализах, анализах связывания Вiasoge/SPR и/или любых других анализах связывания антител, известных из уровня техники. В качестве еще одного примера, полипептиды НА по настоящему изобретению можно использовать

для анализа и/или сравнения эффективности антител к НА.

Полипептиды НА по настоящему изобретению или их фрагменты также могут быть применимы для получения терапевтических антител и/или антител, которые можно использовать в качестве инструментов для исследования или для любого другого требуемого применения. Например, полипептиды НА по настоящему изобретению можно использовать для иммунизации животных, отличных от человека, с целью получения антител к белку НА для применения в качестве инструментов для исследования и/или в качестве терапевтических средств. Затем от данного животного можно получить такие антитела, которые могут быть моноклональными или поликлональными, и/или клетки, которые продуцируют такие антитела.

Полипептиды по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического инструмента могут содержать метку, применимую для любой методики выявления, подходящей для данного анализа. Используемая метка будет зависеть от конкретных используемых методик и/или способов выявления/анализа/диагностики. Способы можно осуществлять в растворе, или полипептид(полипептиды) по настоящему изобретению можно связать с носителем или прикрепить к носителю или подложке, например, микротитрационным планшетам (например, для ELISA), мембранам и шарикам и т.п.

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

Примеры

Пример 1. Растворимые полипептиды НА - структурные и схематические элементы полипептидов по настоящему изобретению

Для получения растворимых полипептидов, характеризующихся наличием эктодомена гемагглютина вируса гриппа А (НА0), НА необходимо экспрессировать без его нативного трансмембранного и цитоплазматического домена. Экспрессия стабильного тримерного растворимого НА дикого типа (WT) часто очень низкая в клетках млекопитающих. Для улучшения по меньшей мере уровня тримеризации тримеризационный домен сборки часто подвергается слиянию с С-концом полипептида посредством методов генетической инженерии. Добавление домена сборки вводит нежелательный неопзитоп и часто снижает уровень экспрессии или может изменить структуру полипептида. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что уровни экспрессии и тримеризации растворимых стабильных тримеров НА можно повысить без добавления домена сборки или любых других неприродных тримеризационных последовательностей посредством введения конкретных аминокислотных мутаций в основную часть полипептида НА, в частности в аминокислотные положения 355 и 432 или в аминокислотные положения 355, 380 и 432. Следует отметить, что для нумерации аминокислотных положений в мономерах НА по настоящему изобретению используется нумерация H3 по Winter et al. 1981 (выше). Таким образом, нумерация аминокислотных положений в мономерах полипептида НА по настоящему изобретению соответствует нумерации аминокислотных положений в НА из эталонного штамма H3N2 вируса гриппа, в частности эталонного штамма H3N2 A/Aichi/2/68 (характеризующегося аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1).

Основные структурные элементы и положения ключевых мутаций в соответствии с настоящим изобретением показаны на фиг. 1А в НА из штамма H1 A/California/07/2009 вируса гриппа А (фиг. 1А). Как показано, мономер НА содержит усеченный домен НА2 (домен НА2, в частности, был усечен после аминокислотного положения 514 (т.е. С-концевая часть домена НА2, начинающаяся с аминокислоты в положении 515, была подвергнута делеции) с делецией трансмембранного и цитоплазматического домена и с получением растворимого эктодомена НА (фиг. 1В).

Полипептиды по настоящему изобретению можно сделать устойчивыми к расщеплению протеазами посредством мутации по типу замены аминокислоты аргинина (R) из природного одноосновного сайта расщепления в положении 329 (фиг. 1В), например, на глутамин (Q). В отличие от нативного полноразмерного НА полипептиды, содержащие мутацию R329Q, не могут быть расщеплены сериновыми протеазами (например, трипсином). Расщепление НА позволяет белку подвергаться конформационному изменению, необходимому для слияния с мембраной и проникновения вируса.

Пример 2. Экспрессия растворимого стабилизированного НА по сравнению с НА дикого типа в различных подтипах

В данном примере несколько НА из вирусов гриппа как из группы 1, так и из 2-й группы, отбирали и экспрессировали в виде стабилизированных растворимых тримерных полипептидов НА, а также сравнивали с их соответствующими растворимыми эктодоменами НА дикого типа (т.е. без трансмембранного и внутрицитоплазматического доменов). В соответствии с настоящим изобретением триптофан (W) в положении 355 и изолейцин (I) в положениях 380 и 432 вводили в аминокислотные последовательности НА пяти различных штаммов группы 1 и пяти различных штаммов группы 2, включая восемь наиболее циркулирующих подтипов у людей (фиг. 2А), если эти аминокислоты все еще присутствовали в аминокислотной последовательности НА. Кроме того, в некоторые полипептиды в верхнюю часть А-спирали в положении 388 вводили метионин (M). В положении 478 вводили изолейцин или не вносили изменений, если он уже присутствовал в последовательностях WT, за исключением полипептида, полученного из A/Mallard/Netherlands/12/200 (UFV181146) и A/Chicken/Germany/N/1949 (UFV181147).

Уровни экспрессии и тримеризации полипептидов по настоящему изобретению в надосадочной жидкости культуры Expi293F сравнивали с соответствующими растворимыми полипептидами WT без мутаций по настоящему изобретению.

В табл. 1 представлены полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, которые были получены.

Таблица 1

Полипептиды по настоящему изобретению

Полипептид (SEQ ID NO)	355W	380I	388M	432I	478I
UFV181009 (10)	+	+	+	+	+
UFV181091 (12)	+	+	+	+	+
UFV181154 (14)	+	+	+	+	+
UFV181159 (16)	+	+	+	+	+
UFV181156 (18)	+	+	+	+	+
UFV180660 (20)	+	+		+	+
UFV181096 (22)	+	+		+	+
UFV180661 (24)	+	+	+	+	+
UFV180664 (26)	+	+	+	+	
UFV180662 (28)	+	+	+	+	

+ означает присутствие указанной аминокислоты в указанном положении; пустая ячейка означает отсутствие указанной аминокислоты (т.е. присутствие аминокислотного остатка дикого типа).

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, приведенные на фиг. 2 и в табл. 1, синтезировали (GenScript) и клонировали в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная плазида pcDNA3 с усиленным промотором CMV). Полипептиды по настоящему изобретению содержали С-концевую часть линкер-сортаза-линкер-His-метка для целей сайт-специфического биотинилирования, скрининга и очистки, и их получали в микромасштабе (200 мкл) в суспензии эукариотических клеток линии Expi293F. Полноразмерные (FL) полипептиды НА дикого типа (WT) содержали линкер-His-метку для целей скрининга.

Клетки подвергали временной трансфекции с применением ДНК промышленного типа (с уровнем эндотоксина $\leq 0,01$ EU/мкг и содержанием суперспиралей $\geq 90\%$) в 96-луночных планшетах с лунками глубиной в половину высоты планшета (System Duetz) при плотности клеток, составляющей $2,5E+06$ vc/мл с применением набора для трансфекции ExpiFectamine 293 (Gibco, ThermoFisher Scientific) и инкубировали во встряхиваемых колбах, содержащих среду для экспрессии Expi293 (Gibco, ThermoFisher Scientific), при 37°C, 250 об/мин, 8% CO₂ и 75% влажности. Образцы надосадочной жидкости культур клеток, содержащие секретируемые полипептиды, собирали на 3-й день и осветляли посредством центрифугирования (10 мин при 400xg) с последующей фильтрацией (96-луночные фильтровальные планшеты, мембрана из PVDF толщиной 0,22 мкм, Corning).

Уровень экспрессированного растворимого полипептида НА в собранной надосадочной жидкости культуры оценивали посредством биослойной интерферометрии с применением платформы ОСТЕТ (FortéBio). Вкратце, стандартную кривую строили с применением биосенсоров на основе антител к HIS (HIS2) (FortéBio) посредством измерения сдвига связывания в серии разведений строго определенной эталонной партии очищенного полипептида UFV180436. Затем измеряли сдвиги связывания предвари-

тельно разбавленных (в буфере для кинетического анализа, FortéBio) образцов надосадочной жидкости культуры клеток, содержащих полипептиды по настоящему изобретению, и концентрацию полипептидов рассчитывали с применением построенной стандартной кривой.

Наличие экспрессированных полипептидов и их четвертичную структуру (которая указывает на то, является ли полипептид мономером, тримером или мультимером) в собранных образцах культуры клеток Expi293F оценивали посредством аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (UHPLC) с применением системы Vanquish (ThermoFisher Scientific) с колонкой ВЕН 200А (Waters, вводимый объем 40 мкл, скорость потока 0,35 мл/мин). Элюирование контролировали с помощью детектора светорассеяния Helios (Wyatt Technologies). SEC-профили анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6 (Wyatt Technology).

Результаты и вывод.

Введение триптофана в положение 355 и изолейцина в положения 380 и/или 432 в НА дикого типа из различных штаммов приводило к повышению экспрессии всех тестируемых полипептидов по настоящему изобретению, как определено с помощью ОСТЕТ (фиг. 2В).

SEC-анализ неочищенных образцов надосадочной жидкости культуры клеток демонстрировал, что при введении стабилизирующих мутаций в полипептиды по настоящему изобретению для всех растворимых стабилизированных НА появляется отчетливый пик тримеров (Т) при времени удержания от 6 до 7 мин, что выше, чем в случае пиков тримеров, наблюдаемых для соответствующих эктодоменов НА дикого типа (фиг. 2С). Следует отметить, что различия во времени удержания между разными подтипами НА вируса гриппа, вероятно, связаны с различиями в уровне и сложности гликозилирования.

В совокупности эти данные подтверждают, что введение мутаций 355W, 380I и/или 432I в полипептиды НА по настоящему изобретению приводит к повышению экспрессии и образованию стабильного растворимого тримерного НА.

Пример 3. Определение *in vitro* характеристик очищенного тримерного полноразмерного НА по сравнению с НА дикого типа, содержащим тримеризационный домен сборки.

Для дополнительного определения вклада важных стабилизирующих мутаций 355W, 380I и/или 432I данные мутации вводили в полипептиды эктодомена НА (т.е. за исключением ТМ и IC доменов), полученные из штаммов H1 A/California/07/2009 (UFV181009), A/Michigan/45/2015 (UFV181091) и штаммов H3 A/Hong Kong/1/1968 (UFV180660) и A/Indiana/11/2011 (UFV181099), и сравнивали с эктодоменами НА дикого типа (WT), содержащими тримеризационный домен сборки (за исключением UFV4239 (SEQ ID NO: 29), который не содержал тримеризационный домен сборки). Полипептиды содержали аминокислоты, показанные в табл. 2. Все полипептиды дополнительно содержали His-метку для целей очистки и скрининга и их продуцировали в клетках ExpiCHO, после чего их очищали и определяли их характеристики.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды получали в суспензии клеток ExpiCHO (в масштабе 350 мл) и клетки культивировали в среде для экспрессии ExpiCHO посредством временной трансфекции с помощью соответствующей ДНК промышленного типа с применением реагента для трансфекции ExpiFectamine (Gibco, ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. К культурам клеток через 1 день после трансфекции добавляли стимулятор ExpiFectamine CHO и подпитку ExpiCHO (Gibco, ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Суспензии трансфицированных клеток ExpiCHO инкубировали при 32°C, 5% CO₂ и между 7-м и 11-м днями собирали образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие секретированные полипептиды. Образцы надосадочной жидкости культуры осветляли посредством центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, вставленный в крышку бутылки (Corning).

Из собранных образцов надосадочной жидкости культуры и из соответствующих штаммов дикого типа меченные гистиридиновой меткой полипептиды по настоящему изобретению, содержащие тримеризационный домен сборки, очищали по двухстадийному протоколу с применением системы АКТА Avant 25 (GE Healthcare Life Sciences). Во-первых, проводили аффинную хроматографию с иммобилизованным металлом с применением предварительно загруженной колонки для очистки с помощью His-метки с Omplete His-tag Purification Column (Roche), промывали с помощью 1 мМ имидазола и элюировали с помощью 300 мМ имидазола. Во-вторых, проводили эксклюзионную хроматографию с применением колонки HiLoad Superdex 200 pg 26/600 (GE Healthcare Life Sciences). Фракции пика тримеров объединяли, замораживали и хранили (1 и 6 месяцев) при -80°C.

Содержание тримеров очищенных полипептидов по настоящему изобретению оценивали посредством аналитической SEC с применением сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (UHPLC), как описано в примере 2. Вводили 20 мкг каждого очищенного полипептида и прогоняли через колонку.

Термостабильность очищенных полипептидов определяли посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) посредством контроля флуоресцентного излучения оранжевого красителя Sypro (ThermoFisher Scientific), добавленного к раствору полипептида массой 6 мкг. При постепенном повышении температуры с 25°C до 95°C (60°C в час) полипептиды разворачиваются, а флуоресцентный

краситель связывается с экспонированными гидрофобными остатками, что приводит к характерному изменению излучения. Кривые плавления измеряли с применением устройства ViiA7 для ПЦР в реальном времени (Applied BioSystems) и значения T_{m50} рассчитывали с помощью пакета программного обеспечения Spotfire (Tibco Software Inc.). Значения T_{m50} представляют собой температуру, при которой 50% белка разворачивается, и, таким образом, являются мерой температурной стабильности полипептидов.

Трехмерную конформацию очищенных полипептидов оценивали посредством тестирования антигенности в ELISA (значения EC_{50} связывания антитела). С этой целью полипептиды покрывали при концентрации 10 нМ и инкубировали с серией разбавлений моноклональных антител (mAb), в частности CR6261 (специфическое в отношении группы 1), CR8020 (специфическое в отношении группы 2), CR9114 (специфическое в отношении групп 1 и 2) и MD3606 (мультидоменное антитело, специфическое в отношении групп 1 и 2), с применением 70 нМ в качестве начальной концентрации. Связывание антител определяли посредством инкубации с конъюгированным с HRP вторичным антителом к человеческому Fc (мышинное антитело к человеческому IgG, Jackson ImmunoResearch) и визуализировали посредством добавления субстрата POD. Считывание проводили с применением многорежимного планшетридера EnSight™ (PerkinElmer). Значения EC_{50} , полученные в ходе двух независимых экспериментов, рассчитывали с применением пакета программного обеспечения Spotfire (Tibco Software Inc.), и на фиг. 3D указаны среднее значение и стандартное отклонение.

Результаты и вывод.

Таблица 2

Полипептиды по настоящему изобретению

Полипептиды (SEQ ID NO)	355W	380I	388M	432I	478I
UFV181009 (10)	+	+		+	+
UFV181091 (12)	+	+		+	+
UFV180660 (20)	+	+	+	+	
UFV181099 (33)	+	+		+	

Результаты SEC-анализа подтвердили, что наличие (или одновременное введение стабилизирующих) аминокислот в полипептидах по настоящему изобретению из штаммов вируса гриппа с различными НА позволяет осуществлять очистку высокочистых и стабильных растворимых тримерных полипептидов НА. Стабилизирующий эффект аминокислот лучше всего наблюдали в случае очищенного полипептида, полученного из H1 A/California/07/2009 (UFV181009), где соответствующая конструкция дикого типа (UFV4239, SEQ ID NO: 29) не содержала тримеризационный домен сборки и демонстрировала лишь пик мономеров, тогда как стабилизированный полипептид по настоящему изобретению характеризуется пиком высокочистых тримеров (фиг. 3А). Молекулы НА дикого типа из другого штамма H1 A/Michigan/45/2015 и штаммов H3 A/Hong Kong/1/1968 и A/Indiana/11/2011 экспрессировались с дополнительным С-концевым доменом сборки и действительно образовывали тримерный НА. Тем не менее, в отличие от соответствующих стабилизируемых полипептидов по настоящему изобретению тримерные пики НА дикого типа с доменом сборки были более широкими, асимметричными и характеризовались наличием плеч, что свидетельствует о наличии альтернативных высокомолекулярных и/или низкомолекулярных полипептидов в нежелательной конформации (*) или с менее плотной укладкой (Seok et al., Sci. Rep. 8;7(1)-7540, 2017).

Дополнительное определение характеристик полипептидов демонстрировало, что полипептиды по настоящему изобретению, содержащие стабилизирующие аминокислоты, характеризуются значительно более высокой термостабильностью по сравнению с полипептидами WT с (UFV4239, SEQ ID NO: 29) тримеризационным доменом сборки или без него (фиг. 3В и 3С).

Введенные стабилизирующие мутации являются скрытыми мутациями (т.е. они расположены внутри полипептида НА, а не на его поверхности) и поэтому не должны влиять на поверхность мономерного или тримерного НА. Для подтверждения целостности поверхности НА посредством ELISA оценивали связывание панели хорошо известных нейтрализующих антител широкого спектра действия с полипептидами. Полипептиды дикого типа и стабилизированные полипептиды по настоящему изобретению характеризовались сопоставимым связыванием со значениями EC_{50} в низком наномолярном диапазоне со всеми антителами в соответствии с их ожидаемой степенью связывания. Наблюдали улучшение (~ 4-8-кратное) в случае связывания CR9114 с полипептидами НА по настоящему изобретению, полученными из H3 A/Hong Kong/1/1968 и H3 A/Indiana/11/2011 (фиг. 3D).

В заключение необходимо отметить, что описанные полипептиды по настоящему изобретению очищали от надосадочной жидкости культуры клеток в виде высокочистых тримерных полипептидов и они характеризовались улучшенной термостабильностью по сравнению с НА WT (с тримеризационным доменом сборки или без него) и были правильно свернуты.

Пример 4. Определение характеристик комбинаций стабилизирующих мутаций

Для оценки благоприятного эффекта комбинации стабилизирующих мутаций в полипептидах по

настоящему изобретению комбинацию 355W+478I и комбинацию 380I+432I поэтапно вводили в эктодомен HA из штамма H1 A/California/07/2009 (фиг. 4А, '!' указывает на неизменное наличие остатка H1 дикого типа (WT), как указано в первой строке).

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие С-концевую часть линкер-сортаза-линкер-His-метка для целей сайт-специфического биотинилирования, скрининга и очистки продуцировали в микромасштабе в эукариотических клетках Expi293F (200 мкл), как описано в примере 2. Уровень экспрессированного полипептида определяли с помощью ОСТЕТ и содержание тримеров анализировали посредством аналитической SEC, как описано в примере 2.

Результаты и вывод

Оценка уровней экспрессии полипептидов по настоящему изобретению с различными комбинациями стабилизирующих мутаций позволила выявить, что мутации 380I и 432I, присутствующие в UFV181007 (SEQ ID NO: 35), не оказывали влияния на экспрессию, но по сравнению с конструкцией WT значительно повышали уровень тримеров (фиг. 4B). Добавление мутаций 355W и 478I (например, UFV181005: SEQ ID NO: 34) приводило к заметному повышению экспрессии (фиг. 4А), но образования тримеров не наблюдалось (фиг. 4B). При применении комбинации 355W, 478I, 380I и 432I (например, в UFV181009: SEQ ID NO: 10) одновременно повышался уровень экспрессии (фиг. 4А) и значительно повышалось содержание тримеров в надосадочной жидкости культуры клеток (фиг. 4B).

В заключение необходимо отметить, что мутации 355W и 478I повышали уровни экспрессии полипептидов по настоящему изобретению, тогда как мутации 380I и 432I повышали образование тримеров. Комбинация стабилизирующих мутаций синергически повышала экспрессию и уровни тримеров полипептидов по настоящему изобретению.

Пример 5. Экспрессия дополнительного растворимого стабилизированного HA по сравнению с HA дикого типа в различных подтипах HA.

В данном примере дополнительно экспрессировали дополнительные стабилизированные HA и сравнивали с их соответствующими растворимыми эктодоменами HA дикого типа (фиг. 5А). Триптофан (W) в положении 355 и изолейцин (I) в положениях 380 и 432 вводили в аминокислотные последовательности HA из двух дополнительных штаммов группы 1 и четырех дополнительных штаммов группы 2. Через три дня после трансфекции уровни экспрессии и тримеризации полипептидов в образцах надосадочной жидкости культуры Expi293F сравнивали с соответствующими растворимыми полипептидами WT без мутаций по настоящему изобретению. В табл. 4 представлены дополнительные полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, которые были получены.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Плазмидами трансфицировали эукариотические клетки Expi293F в микромасштабе (200 мкл), как описано в примере 2. Все полипептиды экспрессировали с включением С-концевой последовательности линкер-His-метка для целей скрининга и очистки, тогда как стабилизированные полипептиды содержали предшествующую His-метке дополнительную последовательность сортаза-линкер для сайт-специфического биотинилирования. Уровень экспрессированного полипептида определяли с помощью ОСТЕТ и содержание тримеров анализировали посредством аналитической SEC, как описано в примере 2.

Результаты и вывод

Аналогично наблюдениям в примере 2, введение триптофана в положение 355 и изолейцина в положения 380 и/или 432 в HA дикого типа из различных штаммов приводило к повышению экспрессии всех данных дополнительно протестированных полипептидов на основании измерений с помощью ОСТЕТ. Одно исключение было замечено в случае HA, полученного из H1 A/South Carolina/1/1918 (UFV181084), которое заключалось в небольшом снижении по результатам определения с помощью ОСТЕТ (фиг. 5А), но не по результатам измерения площади под кривой при SEC (фиг. 5B).

SEC-анализ неочищенной надосадочной жидкости культуры клеток демонстрировал, что при введении стабилизирующих мутаций во все дополнительные растворимые стабилизированные HA наблюдалось большее количество тримерного полипептида (Т) и меньшее количество мономерного полипептида (М) и наблюдались высокомолекулярные разновидности по сравнению с соответствующими эктодоменами HA дикого типа (фиг. 5B). Как отмечено в примере 2, различия во времени удержания между разными подтипами HA вируса гриппа, вероятно, связаны с различиями в уровне и сложности гликозилирования.

В совокупности эти данные подтверждают, что введение мутаций 355W, 380I и/или 432I в дополнительные полипептиды HA по настоящему изобретению приводит к повышению экспрессии и образованию стабильного растворимого тримерного HA.

Пример 6. Определение характеристик *in vitro* очищенного тримерного полноразмерного HA (дополнительные данные).

В данном примере экспрессировали, очищали и подвергали длительному температурному стрессу дополнительные стабилизированные HA. Данные HA, UFV190839 (SEQ ID NO: 50), UFV190068 (SEQ ID NO: 51) и UFV190841 (SEQ ID NO: 52), получали из H3 A/Hong Kong/1/1968, H7 A/Mallard/NL/12/2000 и

H10 A/Chick/Germany/N/1949 соответственно. Вкратце, очищенный тримерный полипептид хранили в течение 60 дней при 4°C (в холодильнике) и 37°C (в термостате), после чего целостность белка оценивали посредством аналитической SEC.

В соответствии с настоящим изобретением триптофан (W) в положении 355 и изолейцин (I) в положениях 380 и 432 вводили в аминокислотные последовательности НА из трех различных штаммов группы 2.

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды продуцировали в эукариотических клетках ExpiCHO в среднем масштабе (30 мл), как описано в примере 3, и собирали на 5-й день. Все полипептиды экспрессировали с включением С-концевой последовательности линкер-сортаза-линкер-His-метка для целей сайт-специфического биотинилирования, скрининга и очистки. Белки очищали посредством двухстадийного способа, как описано в примере 3, однако в данном случае использовали колонку HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences). Уровень экспрессированного полипептида определяли с помощью ОСТЕТ и содержание тримеров анализировали посредством аналитической SEC, как описано в примере 2, с тем исключением, что в данном случае использовали колонку Unix-C 300 A (Sepax Technologies).

Результаты и вывод

Результаты SEC-анализа указывали, что полученные после очистки полипептиды по настоящему изобретению, содержащие стабилизирующие аминокислоты, были высокочистыми и тримерными. Более того, растворимые полипептиды НА были устойчивы к температурному стрессу; 60-дневная инкубация при 4°C и 37°C не оказывала влияния на количество белка и тримерное состояние по сравнению с наблюдаемыми результатами в случае материала до стресса (фиг. 6), и в случае с НА, полученным из H10, после инкубации при 37°C наблюдали лишь небольшое количество полипептида, отличного от тримерного (время удержания ~ 4,75 мин).

Как отмечено в примере 2, различия во времени удержания между разными подтипами НА вируса гриппа, вероятно, связаны с различиями в уровне и сложности гликозилирования. Кроме того, небольшие различия во времени удержания, наблюдаемые в случае исходного материала по сравнению с материалом, подвергнутым стрессу в течение 60 дней, вероятно связаны со старением колонки (т.е. аналогичный сдвиг наблюдали для внутреннего контроля).

В заключение необходимо отметить, что описанные в данном примере полипептиды по настоящему изобретению очищали из надосадочной жидкости культуры в виде высокочистых тримерных полипептидов и они характеризовались высокой инертностью к температурному стрессу в течение 60 дней.

Таблица 3

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

Последовательности

SEQ ID NO: 1 - гемагглютинин CAA24269.1 (вирус гриппа А (A/Aichi/2/1968(H3N2) (без сигнальной последовательности)

QDLPGNDNST ATLCLGHNAV PNGTLVKTIT DDQIEVTNAT ELVQSSSTGK 50
 ICNNPHRILD GIDCTLIDAL LGDPHCDVFQ NETWDLFVER SKAFSNCYPY 100
 DVPDYASLRS LVASSGTLEF ITEGFTWTGV TQNGGSNACK RGP GSGFFSR 150
 LNWLTKSGST YPVLNVTMPN NDNFDKLYIW GIHHPSTNQE QTSLYVQASG 200
 RVTVSTRRSQ QTIIPNIGSR PWVRLSSRI SIYWTIVKPG DVLVINSNGN 250
 LIAPRGYFKM RTGKSSIMRS DAPIIDTCISE CITPNGSIPN DKPFQNVNKI 300
 TYGACPKYVK QNTLKLATGM RNVPEKQTRG LFGAIAGFIE NGWEGMIDGW

350

YGFRHQNSEG TGQAADLKST QAAIDQINGK LNRVIEKTNE KFHQIEKEFS 400
 EVEGRIQDLE KYVEDTKIDL WSYNAELLVA LENQHTIDLT DSEMKNLFEK 450
 TRRQLRENAE EMGNCFKIY HKCDNACIES IRNGTYDHDV YRDEALNNRF 500
 QIKGVELKSG YKDWILWISF AISCFLLCVV LLGFIMWACQ RGNIRCNICI 550
 БЕЛОК VH CR6261 (SEQ ID NO: 2)

EVQLVESGAEVK KPGSSVKV SCKASGGPFRSYAISWVRQAPGQGPPEWMGGIPIF
 GTTKYAPKFQGRVTITADDFAGTVYMELSSLRSED TAMYYCAKHMGYQVRETMDVW
 GKGTTVTVSS

БЕЛОК VL CR6261 (SEQ ID NO: 3)

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNDYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR
 PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEANYCATWDRRPTAYVVFGGGTKLTVL

БЕЛОК VH CR8020 (SEQ ID NO: 4)

QVQLQQSGAEVKTPGASVKVSKKASGYTFTSFGVSWIRQAPGQGLEWIGWISAY
NGDTYYAQKFQARVTMTTDTSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDN
WGQGLTVTVSS

БЕЛОК VL CR8020 (SEQ ID NO: 5)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRR
ATGIPDRISGSGSGTDFLTISRLEPADFAVYYCQQYGTSPRTFGQGAKEIK

БЕЛОК VH CR9114 (SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKSSGGTSNNY AISWVRQAPGQGLDWMGGISPI
FGSTAYAQKFQGRVTISADIFSN TAYMELNSLTSED TAVYFCARHGNYYYSGMDVWG
QGTTVTVSS

БЕЛОК VL CR9114 (SEQ ID NO: 7)

SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVN WYQQFPGTAPKLLIYSNDQRP
SVVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAEYYCAA WDDSLKGA VFGGGTQLTVL

БЕЛОК MD3606 (SEQ ID NO: 8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSI SIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RD
GSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMG
VYWGK GALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLS CAASGRTYAMGW
FRQAPGKEREFVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDN AKNTEYLEMNNLKPEDTAVYY
CTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
GSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN A
ENTVY LQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI
NTDGGTY YADSVKDRFTISRDN AKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQ
GTQVTVSSDKTHTCPPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

SEQ ID NO 9: UFV181157 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVLLLYTFATANADTLTCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKH
NGKLC LKLRGVAPLHLGKCN IAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFID
YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWP NHDSNKGVT AACPHAGAKSFYKNLIWL VKKGN S
YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTADQQSLYQNADAYV FVGSSRYSKKFKPEIAIR
PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN
TTCQTPKGAIN TSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIA GFIEG
GWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK
EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLV LLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQL
KNNAKEIGNGCFEFYHKDNTCMESVKNGT YDYPKYSEEAKLNREEIDGSHHHHHH

SEQ ID NO 10: UFV181009 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKH
 NGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFID
 YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
 YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIR
 PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN
 TTCQTPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEG
 GWTGMVDGWYGYHWQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNIVNSVIEKMNTQFTA VGKE
 FNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLINERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQ LKN
 NAKEIGNGCFEFYHKCDNTCIESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDSGSLPETGGGSHH
HHHH

SEQ ID NO 11: UFV181134 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKH
 NGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFIN
 YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
 YPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFGTSRYSKKFKPEIAT
 RPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDC
 NTTTCQTPGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIE
 GGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTA VG
 KEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLINERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQ
 LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGSHHHHHH

SEQ ID NO 12: UFV181091 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKH
 NGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFIN
 YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
 YPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFGTSRYSKKFKPEIAT
 RPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDC
 NTTTCQTPGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIE
 GGWTGMVDGWYGYHWQNEQSGYAADLKSTQNAIDKITNIVNSVIEKMNTQFTA VG
 KEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLINERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQ
 LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCIESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDSGSLPETGGG
SHHHHHH

SEQ ID NO 13: UFV181153 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MAIYLILLFAAVRGDQICIGYHSNNSTEKVDTILERNVTVTHAQDILEKTHNGKL
 CKLNGIPPELGDCSIAGWLLGNPECDRLTVPESYIMEKENPRNGLCYPGSFNDYEEL
 KHLSSVTHFEKVKILPRDRWQHTTTGGSRAVSGNPSFFRNMVWLTKKGSNYPIAK
 GSYNNTSGEQMLIHWGVHHPNDDAEQRTLYQNVGTYSVGTSTLNKRSVPEIATRPKV
 NGQGGRMEFSWTILDMLDTINFESTGNLIAPEYGFRIKRGSSGIMKTEGTLENCETKCCQ
 TPLGAINTTLPFHNIHPLTIGECPKYVKSERLVLATGLRNVQIESRGLFGAIAGFIEGGW
 QGMVDGWYGYHHSNDQSGYAADKESTQRAIDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFN
 NLEKRELENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLR

DNAKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKSGSHHHHHH

SEQ ID NO 14: UFV181154 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MAIYLILLFAAVRGDQICIGYHSNNSTEKVDILERNVTVTTHAQDILEKTHNGKL
 CKLNGIPPELGDCSIAGWLLGNPECDRLLTVPEWSYIMEKENPRNGLCYPGSFNDYEEEL
 KHLSSVTHFEKVKILPRDRWTQHNTTGGSRACAVSGNPSFFRNMVWLTKKGSNYPIAK
 GSYNNTSGEQMLIHWGVHHPNDDAEQRTLYQNVGTYVSVGTSTLNKRSVPEIATRPKV
 NGQGGRMEFSWTILDMLDTINFESTGNLIAPEYGFRIKRGSSGIMKTEGTLENCETKCCQ
 TPLGAINTTLPFHNIHPLTIGECPKYVKSERLVLATGLRNVQPQIESRGLFGAIAGFIEGGW
 QGMVDGWYGYHWSNDQSGYAADKESTQRAIDGITNIVNSVIEKMNTQFEAVGKEFN
 NLEKRELENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMINERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQRLD
 NAKELGNGCFEFYHKCDDECINSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKSGSLPETGGGSHH
HHHH

SEQ ID NO 15: UFV181158 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MEKIVLLFAIVSLVQSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNG
 KLCSLNGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFNLNPEWSYIVEKDSPINGLCYPGDFNDY
 EELKHLSSSTNHFEKIQIIPRSSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWLKKNNAIPT
 IKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYVSVGTSTLNQRSVPEIATRPK
 VNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSGLEYGNCNTK
 CQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSDDLVLATGLRNVQRETRGLFGAIAGFIEG
 GWQGMVDGWYGYLHSNEQSGYAADKESTQKAIDGITNKINSIIDKMNTQFEAVGKEF
 NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLR
 DNAKELGNGCFEFYHKCDDECMESVRNGTYDYPQYSEEARLNREEISGSHHHHHH

SEQ ID NO 16: UFV181159 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MEKIVLLFAIVSLVQSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNG
 KLCSLNGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFNLNPEWSYIVEKDSPINGLCYPGDFNDY
 EELKHLSSSTNHFEKIQIIPRSSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWLKKNNAIPT
 IKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYVSVGTSTLNQRSVPEIATRPK
 VNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSGLEYGNCNTK
 CQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSDDLVLATGLRNVQRETRGLFGAIAGFIEG
 GWQGMVDGWYGYLWSNEQSGYAADKESTQKAIDGITNIINSIIDKMNTQFEAVGKEF
 NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMINERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLR
 DNAKELGNGCFEFYHKCDDECIESVRNGTYDYPQYSEEARLNREEISSGSLPETGGGSH
HHHH

SEQ ID NO 17: UFV181155 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

METISLITILLVVTASNADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHN
 GMLCATSLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCDLLLGGREWSYIVERSSAVNGTCYPGNVEN
 LEELRTLFSASSYQRIQIFPDTTWNVTYTGTSRACSGSFYRSMRWLTQKSGFYVPVQDAQ
 YTNNRGKSILFVWGIHHPPTYTEQTNLYIRNDTTTSVTEDLNRTFKPVIGPRPLVNLQ
 GRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYGHVLSGGSHGRILKTDLKGGNCVVQCQTE
 KGGLNSTLPPHNSKYAFGTCPKYVRVNSLKLAVGLRNVPARSSRGLFGAIAGFIEGGWP

GLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRSTQKAIDKITSKVNIVDKMKNQYEIIDHEFSEV
 ETRLNMINNKIDDQIQDVWAYNAELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNA
 MEDGKGFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIEGSHHHHHH

SEQ ID NO 18: UFV181156 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

METISLITILLVVTASNADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHN
 GMLCATSLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCDLLLGGREWSYIVERSSAVNGTCYPGNVEN
 LEELRTLFSASSYQRIQIFPDTTWNVTYTGTSRACSGSFYRSMRWLTQKSGFYVPVQDAQ
 YTNNRGKSILFVWGIHHPPTYTEQTNLYIRNDTTTSVTEDLNRTFKPVIGPRPLVNLQ
 GRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYGHVLSGGSHGRILKTDLKGGNCVVQCQTE
 KGGLNSTLPPFHNISKYAFGTCPKYVRVNSLKLAVGLRNVPARSSRGLFGAIAAGFIEGGWV
 GLVAGWYGFQWSNDQGVGMAADRSTQKAIDKITSIVNNIVDKMKNQYEIIDHEFSEV
 ETRLNMINNKIDDQIQDVWAYNAELLVLLINQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNA
 MEDGKGFELYHKCDDQCIETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIESGSLPETGGGSHHHH
HH

SEQ ID NO 19: UFV181141 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSIFYFLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAT
 ELVQSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPY
 DVPDYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGPVSGGFFSRLNWLTKSGS
 TYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIGS
 RPWVRGLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISE
 CITPINGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIE
 NGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQA AIDQINGKLN RVIEKTNEKFHQIEKE
 FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRE
 NAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVGSHHHHHH

SEQ ID NO 20: UFV180660 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSIFYFLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAT
 ELVQSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPY
 DVPDYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGPVSGGFFSRLNWLTKSGS
 TYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIW
 SRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISE
 CITPINGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIE
 NGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQA AIDQINGILN RVIEKMNEKFHQIEKE
 FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLREN
 AEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGNYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSH
HHHHH

SEQ ID NO 21: UFV181137 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSIFYLCLVFAQKLPNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNAT
 ELVQSSSTGRICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPHCDGFGQNKEDWDLFVERSKAYSNCYPY
 DVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWTVGAQNGTSSACKRRSNKSSFFSRLNWLHQLK
 YKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPSTDSQISYQAASGRVTVSTKRSQQTVIPNIG

SSPWVRGVSSRSIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAIGKCNSEC
ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEN
GWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNEKFHQIEKEF
SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFFERTKKQLREN
AEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVGSHHHHHH

SEQ ID NO 22: UFV181096 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALS YILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHA VSNGLTVKTITNDQIEVTNAT
ELVQSSSTGRICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPHCDGFGQNKEDLFFVERSKAYSNCYPY
DVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWTGVAQNGTSSACKRRSNKSFPSRLNWLHQLK
YKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPSTSDQISYQAASGRVTVSTKRSQQTVPINIG
SSPWVRGVSSRSIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAIGKCNSEC
ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEN
GWEGMVDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGILNRLIEKTNEKFHQIEKEF
SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNLFFERTKKQLREN
AEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSH
HHHHH

SEQ ID NO 23: UFV181145 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MIALILVALALSHTAYSQITNGTTGNPIICLGHHA VENGTSVKTLTDNHVEVVSA
KELVETNHTDELCPSPKLVDGQDCDLINGALGSPGCDRLQDTTWDVFIERTPAVDTCY
PFDVDPDYQSLRSILASSGSLEFIAEQFTWNGVKVDGSSSACLRRGRNSFFSRLNWLTKET
NGNYGPINVTKENTGSYVRLYLWGVHHPSSDNEQTDLYKVATGRVTVSTRSDQISIVPN
IGSRPRVRNQSGRISYWTLVNPGDSEIFNSIGNLIAPRGHYKISKSTKSTVLKSDKRIGSCT
SPCLTDKGSIQSDKPFQNVSRIAIGNCPKYVKQGSMLLATGMRNIPGKQAKGLFGAIAGF
IENGWQGLIDGWYGFRHQNAEGTGTAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNEKYHQIEK
EFEQVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDVTDSEMKNLFFERVRRQLR
ENAEDQGNGCFEIFHQCDNNCIESIRNGTYDHNIRDEAINNRIKINPVGSHHHHHH

SEQ ID NO 24: UFV180661 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MIALILVALALSHTAYSQITNGTTGNPIICLGHHA VENGTSVKTLTDNHVEVVSA
KELVETNHTDELCPSPKLVDGQDCDLINGALGSPGCDRLQDTTWDVFIERTPAVDTCY
PFDVDPDYQSLRSILASSGSLEFIAEQFTWNGVKVDGSSSACLRRGRNSFFSRLNWLTKET
NGNYGPINVTKENTGSYVRLYLWGVHHPSSDNEQTDLYKVATGRVTVSTRSDQISIVPN
IGSRPRVRNQSGRISYWTLVNPGDSEIFNSIGNLIAPRGHYKISKSTKSTVLKSDKRIGSCT
SPCLTDKGSIQSDKPFQNVSRIAIGNCPKYVKQGSMLLATGMRNIPGKQAKGLFGAIAGF
IENGWQGLIDGWYGFRWQNAEGTGTAADLKSTQAAIDQINGILNRLIEKMNEKYHQIEK
EFEQVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDVTDSEMKNLFFERVRRQLR
ENAEDQGNGCFEIFHQCDNNCIESIRNGTYDHNIRDEAINNRIKINPVSGSLPETGGGSH
HHHHH

SEQ ID NO 25: UFV181146 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MNTQILVFALMAIPTNADKICLGHHA VSNGLTKVNTLTERGVEVVNATETVERT
NVPRICKGKRTVDLGCGLLTITGPPQCDQFLEFSADLIERREGSDVCYPGKFVNEEA

LRQILRESGGIDKETMGFTYSGIRTNGATSACRRSGSSFYAEMKWLLSNTDNAAFPQMT
 KSYKNTRKDPALIIWGIHHSSTTEQTKLYGSGNKLITVSSNYQQSFVPSPGARPQVNG
 QSGRIDFWLILNPNDTVTFSFNGAFIAPDRASFLRGKSMGIQSGVQVDANCEGDCYHS
 GGTIISNLPFQINNSRAVGKCPRYVKQESLLLATGMKNVPEIPKGRGLFGAIAGFIENGW
 EGLIDGWYGFRHQNAQGEFTAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQQFELIDNEFTEVE
 KQIGNVINWTRDSMTEVWSYNAELLVAMENQHTIDLADSEMKNLYERVKRQLRENAE
 EDGTGCFEIFHKCDDDCMASIRNNTYDHSKYREEAMQNRIQIDPVGSHHHHHH

SEQ ID NO 26: UFV180664 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MNTQILVFALMAIPTNADKICLGHHAVSNVGTQVNTLTERGVEVVNATETVERT
 NVPRICKSGKRTVDLQCGLLGTITGPPQCDQFLEFSADLIERREGSDVCYPGKRVNEEA
 LRQILRESGGIDKETMGFTYSGIRTNGATSACRRSGSSFYAEMKWLLSNTDNAAFPQMT
 KSYKNTRKDPALIIWGIHHSSTTEQTKLYGSGNKLITVSSNYQQSFVPSPGARPQVNG
 QSGRIDFWLILNPNDTVTFSFNGAFIAPDRASFLRGKSMGIQSGVQVDANCEGDCYHS
 GGTIISNLPFQINNSRAVGKCPRYVKQESLLLATGMKNVPEIPKGRGLFGAIAGFIENGW
 EGLIDGWYGFRWQNAQGEFTAADYKSTQSAIDQITGILNRLIEKMNQQFELIDNEFTEVE
 EKQIGNVINWTRDSMTEVWSYNAELLVAMINQHTIDLADSEMKNLYERVKRQLRENAE
 EDGTGCFEIFHKCDDDCMASIRNNTYDHSKYREEAMQNRIQIDPVSGSLPETGGGSHHH
HHH

SEQ ID NO 27: UFV181147 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MYKVVVIIALLGAVKGLDRICLGHHAVANGTIVKTLTNEQEEVTNATETVESTN
 LNKLCMKGRSYKDLGNCHPVGMLIGTPVCDPHLTGTWDTLIERENAIACHCYPGATINEE
 ALRQKIMESGGISKMSTGFTYSSINSAGTTKACMRNGGDSFYAELKWLVSCTKGQNF
 QTTNTYRNTDTAEHLIIWGIHHSSTQEKNLDYGTQSLISVESSTYQNNFVPPVVGARPO
 VNGQSGRIDFWTLVQPGDNITFSHNGGLIAPSRVSKLTGRGLGIQSEALIDNSCESKCF
 WRGGSINTKLPFQNLSPRTVQCPKYVNQRSLLLATGMRNVPEVVQGRGLFGAIAGFIE
 NGWEGMVDGWYGFRHQNAQGTGQAADYKSTQAAIDQITGKLNRLIEKTNTEFESIESE
 FSETEHQIGNVINWTKDSITDIWTYQAELLVAMENQHTIDMADSEMNLNLYERVRKQLR
 QNAEEDGKGCFEIYHTCDDSCMESIRNNTYDHSQYREEALLNRLNINSVGSHHHHHH

SEQ ID NO 28: UFV180662 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MYKVVVIIALLGAVKGLDRICLGHHAVANGTIVKTLTNEQEEVTNATETVESTN
 LNKLCMKGRSYKDLGNCHPVGMLIGTPVCDPHLTGTWDTLIERENAIACHCYPGATINEE
 ALRQKIMESGGISKMSTGFTYSSINSAGTTKACMRNGGDSFYAELKWLVSCTKGQNF
 QTTNTYRNTDTAEHLIIWGIHHSSTQEKNLDYGTQSLISVESSTYQNNFVPPVVGARPO
 VNGQSGRIDFWTLVQPGDNITFSHNGGLIAPSRVSKLTGRGLGIQSEALIDNSCESKCF
 WRGGSINTKLPFQNLSPRTVQCPKYVNQRSLLLATGMRNVPEVVQGRGLFGAIAGFIE
 NGWEGMVDGWYGFRWQNAQGTGQAADYKSTQAAIDQITGILNRLIEKMNTEFESIESE
 FSETEHQIGNVINWTKDSITDIWTYQAELLVAMINQHTIDMADSEMNLNLYERVRKQLRQ
 NAEEDGKGCFEIYHTCDDSCMESIRNNTYDHSQYREEALLNRLNINSSGSLPETGGGSHH
HHH

SEQ ID NO 29: UFV4239 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKH
 NGKLCCLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFID
 YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
 YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIR
 PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN
 TTCQTPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSISQGLFGAIAGFIEG
 GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK
 EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQL
 KNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGRSLVPRGSG
HHHHHH

SEQ ID NO 30: UFV180843 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVLLYTFATTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKH
 NGKLCCLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFIN
 YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
 YPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFGTSRYSKKFKPEIAT
 RPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFMERNAGSGIIISDTPVHDC
 NTTTCQTPGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIE
 GGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTAVG
 KEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQ
 LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDSGSLVPSGSP
 GSGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEVLLSTFLGGSLPETGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 31: UFV180436 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKITITDDQIEVTNAT
 ELVQSSSTGKICNPNHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPY
 DVDPDYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRPGSGFFSRLNWLTKSGS
 TYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIGS
 RPWVRGLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISE
 CITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIE
 NGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLN RVIEKTNEKFHQIEKE
 FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRE
 NAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQSGSLVPSGSPGSGYI
 PEAPRDGQAYVRKDGGEVLLSTFLGGSLPETGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 32: UFV170466 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIVALSYILCLVFAQKLPNDNSTATLCLGHHA VPNGTIVKITINDQIEVTNA
 TELVQSSSTGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYP
 YDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWVTGVTQNGTSSACIRRSNSSFSSRLNWLTHLNF
 KYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGS
 RPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITP
 NGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGW
 EGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSE

VEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTKKQLRENAE
DMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYNHDVYRDEALNNRFQSGSLVPRGSGSGYIPEAP
RDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO 33: UFV181099 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIVALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNA
TELVQSSSTGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKEYSNCYP
YDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNF
KYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQA VIPNIGS
RPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITP
NGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGW
EGMVDGWYGFRWQNSEGRQAADLKSTQAAIDQINGILNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEV
EGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNLFEKTKKQLRENAED
MGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYNHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSHH
HHH

SEQ ID NO 34: UFV181005 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVLLYTFATANADTLICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKH
NGKLCCLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFID
YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIR
PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN
TTCQTPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSQRSGLFGAIAGFIEG
GWTGMVDGWYGYHWQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK
EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQL
KNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCIESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDSGSLPETGGGS
HHHHHH

SEQ ID NO 35: UFV181007 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKAILVLLYTFATANADTLICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDKH
NGKLCCLRGVAPLHLGKCNIAWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFID
YEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNIWLVLKKGNS
YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIR
PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN
TTCQTPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSQRSGLFGAIAGFIEG
GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNIVNSVIEKMNTQFTAVGKE
FNLHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLINERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKN
NAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDSGSLPETGGGSHH
HHHH

SEQ ID NO 36: UFV181090 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSH
NGKLCCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCPYGFHFD
YEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTKNGLY

PNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQKALYHTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAK
 RPKVRDQEGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCD
 AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFI
 EGGWTGMVDGWYGYHWQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNIVNSVIEKMNTQFTAV
 GKEFNKLERRMENLNKKVDDGFIDIWTYNAELLVLLINERTLDFHDSNVKNLYEKVKS
 QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECIESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDSGSLPETGG
GSHHHHHH

SEQ ID NO 37: UFV181135 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSH
 NGKLCCLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFAD
 YEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTGKNGLY
 PNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQKALYHTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAK
 RPKVRDQEGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCD
 AKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSQGLFGAIAGFI
 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAV
 GKEFNKLERRMENLNKKVDDGFIDIWTYNAELLVLLINERTLDFHDSNVKNLYEKVKS
 QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGSHHHHHH

SEQ ID NO 38: UFV181084 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDSH
 NGKLCCLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDLLLASSWSYIVETSNSENGTCYPGDFID
 YEELREQLSSVSSFEKFEIFPKTSSWPNHETTKGVTAACSYAGASSFYRNLLWLTGKSS
 YPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTGTDQQLYQNADAYVSVGSSKYNRRFTPEIA
 ARPKVRDQAGRMNYYWTLLEPGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGSGIITSDAPVHD
 CNTKCQTPHGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFI
 IEGGWTGMIDGWYGYHWQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITNIVNSVIEKMNTQFTAV
 GKEFNLERRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLINERTLDFHDSNVRNLYEKVKSQ
 LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDDACIESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDSGSLPETGGGS
HHHHHH

SEQ ID NO 39: UFV181131 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDSH
 NGKLCCLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDLLLASSWSYIVETSNSENGTCYPGDFID
 YEELREQLSSVSSFEKFEIFPKTSSWPNHETTKGVTAACSYAGASSFYRNLLWLTGKSS
 YPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTGTDQQLYQNADAYVSVGSSKYNRRFTPEIA
 ARPKVRDQAGRMNYYWTLLEPGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGSGIITSDAPVHD
 CNTKCQTPHGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFI
 IEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAV
 GKEFNLERRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLINERTLDFHDSNVRNLYEKVKS
 QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDDACMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGSHHHHHH

SEQ ID NO 40: UFV181095 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHA VPNGTLVKTITNDQIEVTNAT

ELVQSSSTGRICDSPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLWDFVERSKAYSNCYPY
 DVDPDYASLRSLVASSGTLEFINEDFNWTGVAQDGKSYTCKRGSVNSFFSRLNWLHKLEY
 KYPALNVTMPNNGKFDKLYIWGVHHPSTSDQTSLYVRASGRVTVSTKRSQQTVIPNIG
 SRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRNGKSSIMRSDAPIGNCSSSEC
 ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEN
 GWEGMVDGWYGFRWQNSEGTTQAADLKSTQAADQINGILNRLIEKTNEKFHQIEKEF
 SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNKLFERTRKQLREN
 AEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSH
HHHHH

SEQ ID NO 41: UFV181140 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSYLCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHA VPNGTLVKTITNDQIEVTNAT
 ELVQSSSTGRICDSPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLWDFVERSKAYSNCYPY
 DVDPDYASLRSLVASSGTLEFINEDFNWTGVAQDGKSYTCKRGSVNSFFSRLNWLHKLEY
 KYPALNVTMPNNGKFDKLYIWGVHHPSTSDQTSLYVRASGRVTVSTKRSQQTVIPNIG
 SRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRNGKSSIMRSDAPIGNCSSSEC
 ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEN
 GWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAADQINGILNRLIEKTNEKFHQIEKEF
 SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNKLFERTRKQLREN
 AEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVGSHHHHHH

SEQ ID NO 42: UFV181093 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSIFYCQVLAQNLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKTITNDQIEVTNA
 TELVQSSSTGRICDSPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNEKWDLWDFVERSKAFSNCYP
 YDVPDYASLRSLVASSGTLEFINEGFNWTGVTQNGGSYACKRGPDKSFFSRLNWLYESE
 STYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTDKQTNLYVQASGRVTVSTKRSQQTIIPNV
 GSRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDILLINSNGNLIAPRGYFKIRTKGSSIMRSDAPIGTCSSSE
 CITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIE
 NGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTTQAADLKSTQAADQINGILNRVIEKTNEKFHQIEKEF
 SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNKLFKTRRQLREN
 AEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSH
HHHHH

SEQ ID NO 43: UFV181136 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSIFYCQVLAQNLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKTITNDQIEVTNA
 TELVQSSSTGRICDSPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNEKWDLWDFVERSKAFSNCYP
 YDVPDYASLRSLVASSGTLEFINEGFNWTGVTQNGGSYACKRGPDKSFFSRLNWLYESE
 STYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTDKQTNLYVQASGRVTVSTKRSQQTIIPNV
 GSRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDILLINSNGNLIAPRGYFKIRTKGSSIMRSDAPIGTCSSSE
 CITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIE
 NGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAADQINGILNRVIEKTNEKFHQIEKE
 FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNKLFKTRRQLRE
 NAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVGSHHHHHH

SEQ ID NO 44: UFV181097 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNAT
ELVQSSSTGGICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYP
YDVPDYASLRSLVASSGTLEFNDESFNWTGVTQNGTSSSSCKRRSNNSSFFSRLNWLTHLK
FKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPVTDNDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVPINI
GSRPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSEC
ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEN
GWEGMVDGWYGFRWQNSEGIGQAADLKSTQAAINQINGILNRLIGKTNEKFHQIEKEFS
EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTSEMKNLKFERTKKQLRENA
EDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSHH
HHHH

SEQ ID NO 45: UFV181138 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNAT
ELVQSSSTGGICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYP
YDVPDYASLRSLVASSGTLEFNDESFNWTGVTQNGTSSSSCKRRSNNSSFFSRLNWLTHLK
FKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPVTDNDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVPINI
GSRPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSEC
ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIEN
GWEGMVDGWYGFRHQNSEGIGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEF
SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLKFERTKKQLREN
AEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSHHHHHH

SEQ ID NO 46: UFV181148 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MLSIVILFLLVAENSSQNYTGNPVICMGHHAVANGTMVKTLTDDQVEVVTAQEL
VESQNLPELCPSPRLRLVDGQTCDIINGALGSPGCDHLNGAEWDVFIERPNAAMDTCYPFD
VPDYQSLRSILANNGKFEFIAEEFQWTTVKQNGKSGACKRANVNDFFRRLNWLKSDR
NAYPLQNLTKVNNGDYARLYIWGVHHPSTDTEQTNLYKNNPGRVTVSTKTSQTSVIPNI
GSRPWVRGQSGRISFYWTIVEPGDLIVFNTIGNLIAPRGHYKLNNQKKGTTILNTAIPIGSC
VSKCHTDKGSLSSTTKPFQNISRIAIGDCPKYVKQGSLLKATGMRNIPEKASRGLFGAIAG
FIENGWQGLIDGWYGFRHQNAEGTGTAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNEKYHQIE
KEFEQVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDVTSEMKNLKFERRRQL
RENAEDKGNCGFEIFHKCDNNCIESIRNGTYDHDYRDEAINNRFQIQGVGSHHHHHH

SEQ ID NO 47: UFV181149 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MLSIVILFLLVAENSSQNYTGNPVICMGHHAVANGTMVKTLTDDQVEVVTAQEL
VESQNLPELCPSPRLRLVDGQTCDIINGALGSPGCDHLNGAEWDVFIERPNAAMDTCYPFD
VPDYQSLRSILANNGKFEFIAEEFQWTTVKQNGKSGACKRANVNDFFRRLNWLKSDR
NAYPLQNLTKVNNGDYARLYIWGVHHPSTDTEQTNLYKNNPGRVTVSTKTSQTSVIPNI
GSRPWVRGQSGRISFYWTIVEPGDLIVFNTIGNLIAPRGHYKLNNQKKGTTILNTAIPIGSC
VSKCHTDKGSLSSTTKPFQNISRIAIGDCPKYVKQGSLLKATGMRNIPEKASRGLFGAIAG
FIENGWQGLIDGWYGFRWQNAEGTGTAADLKSTQAAIDQINGILNRLIEKTNEKYHQIE
KEFEQVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDVTSEMKNLKFERRRQL

RENAEDKGNCGFEIFHKCDNNCIESIRNGTYDHDYRDEAINNRFQIQGVSGSLPETGGG
SHHHHHH

SEQ ID NO 50: UFV190839 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKTITDDQIEVTNAT
 ELVQSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFNQNETWDLFVERSKAFSNCYPY
 DVDPDYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGP GSGFFSRLNWLT KSGS
 TYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVVHPSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIGS
 RPWVRGLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISE
 CITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIE
 NGWEGMIDGWYGFWRQNSEGTGQAADLKSTQA AIDQINGILNRVIEKTNEKFHQIEKEF
 SEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLREN
 AEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVSGSLPETGGGSH
HHHHH

SEQ ID NO 51: UFV190068 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MNTQILVFALMAIPTNADKICLGHHA VSNGTKVNTLTERGVEVVNATETVERTNVPRI
 CSKGRKTVDLGQCGLLGTITGPPQCDQFLEFSADLIERREGSDVCYPGKFVNEEALRQIL
 RESGGIDKETMGFTYSGIRTNGATSACRRSGSSFYAEMKWLLSNTDNAAFPQMTKSYK
 NTRKDPALIIWGIHHSSTTEQTKLYGSGNKLITVGSNNYQQSFVPSGARPVNGQSGR
 IDFHWLILNPNDTVTFNFNGAFIAPDRASFLRGKSMGIQSGVQVDANCEGDCYHSGGTIIS
 NLPFQINNSRAV GKCPRYVKQESLLLATGMKNVPEIPKGRGLFGAIAGFIE NGWEGLIDG
 WYGFWRQNAQEGETAADYKSTQSAIDQITGILNRLIEKTNQQFELIDNEFTEVEKQIGNV
 INWTRDSMTEVWSYNAELLVAMINQHTIDLADSEMKNLYERVKRQLRENAEEDGTGCF
 EIFHKCDDDCMASIRNNTYDHSKYREEAMQNRIQIDPVSGSLPETGGGSHHHHHH

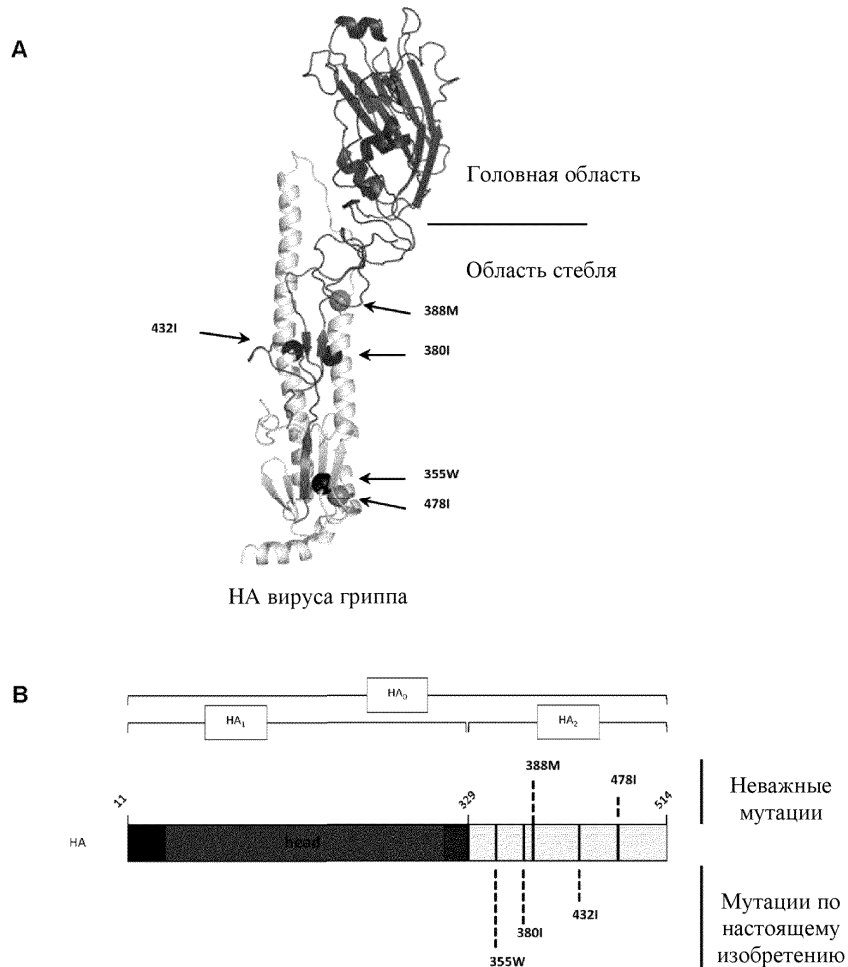
SEQ ID NO 52: UFV190841 (сигнальный пептид и метка подчеркнуты)

MYKVVVIIALLGAVKGDRI CLGHHA VANGTIVKTLTNEQEEVTNATETVESTNL
 NKLCMKGRSYKDLGNCHPVGMLIGTPVCDPHLTGTWDTLIERENAI AHCPGATINEEA
 LRQKIMESGGISKMSTGFTYGSINSAGTTKACMRNGGDSFYAELKWLVS KTKGQNFPPQ
 TTNTYRNTDTAEHLIIWGIHHSSTQEKNLDYGTQSL SISVESSTYQNNFVPVVGARPV
 NGQSGRIDFHWTLVQPGDNITFSHNGGLIAPSRVSKLTGRGLGIQSEALIDNSCESKCFW
 RGG SINTKLPFQNLSPRTVGGCPKYVNQRSLLLATGMRNVPEVVQGRGLFGAIAGFIE
 GWEGMVDGWYGFWRQNAQGTGQAADYKSTQA AIDQITGILNRLIEKTNTEFESIESEFS
 ETEHQIGNVINWTKDSITDIWTYQAELLVAMINQHTIDMADSEMLNLYERVKRQLRQN
 AEEDGKGC FEIYHTCDDSCMESIRNNTYDHSQYREEALLNRLNINSSGSLPETGGGSHHH
HHH

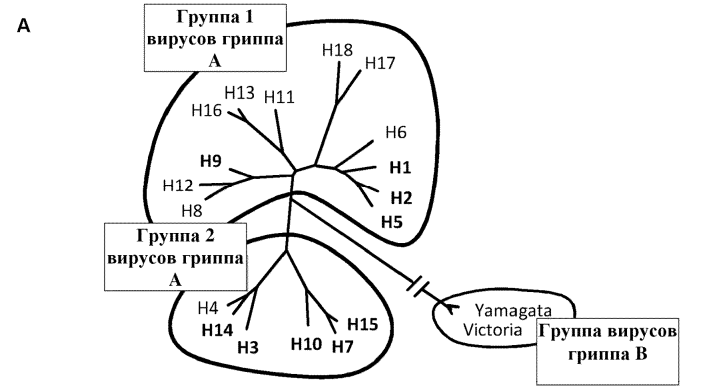
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид гемагглютинина (HA) вируса гриппа А, содержащий домены HA1 и HA2 из HA вируса гриппа А и содержащий аминокислотную последовательность, где:
 - (a) аминокислота в положении 355 представляет собой W, и
 - (b) аминокислота в положении 432 представляет собой I, и аминокислота в положении 380 представляет собой I,
 и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида HA представлена согласно нумерации аминокислот в SEQ ID NO: 1.
2. Полипептид HA по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, где:
 - (a) аминокислота в положении 388 представляет собой M и/или
 - (b) аминокислота в положении 478 представляет собой I.
3. Полипептид HA по п.1 или 2, где полипептид не содержит сайт расщепления протеазой между доменами HA1 и HA2.
4. Полипептид HA по пп.1, 2 или 3, где домены HA1 и HA2 происходят из вируса гриппа А группы 1 и/или группы 2.
5. Полипептид HA по любому из пп.1-4, содержащий усеченный домен HA1 и/или HA2.
6. Полипептид HA по п.5, где трансмембранный и внутрицитоплазматический домены были делетированы из домена HA2.
7. Полипептид HA по п.5 или 6, где по меньшей мере С-концевая часть домена HA2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 515, была делетирована.

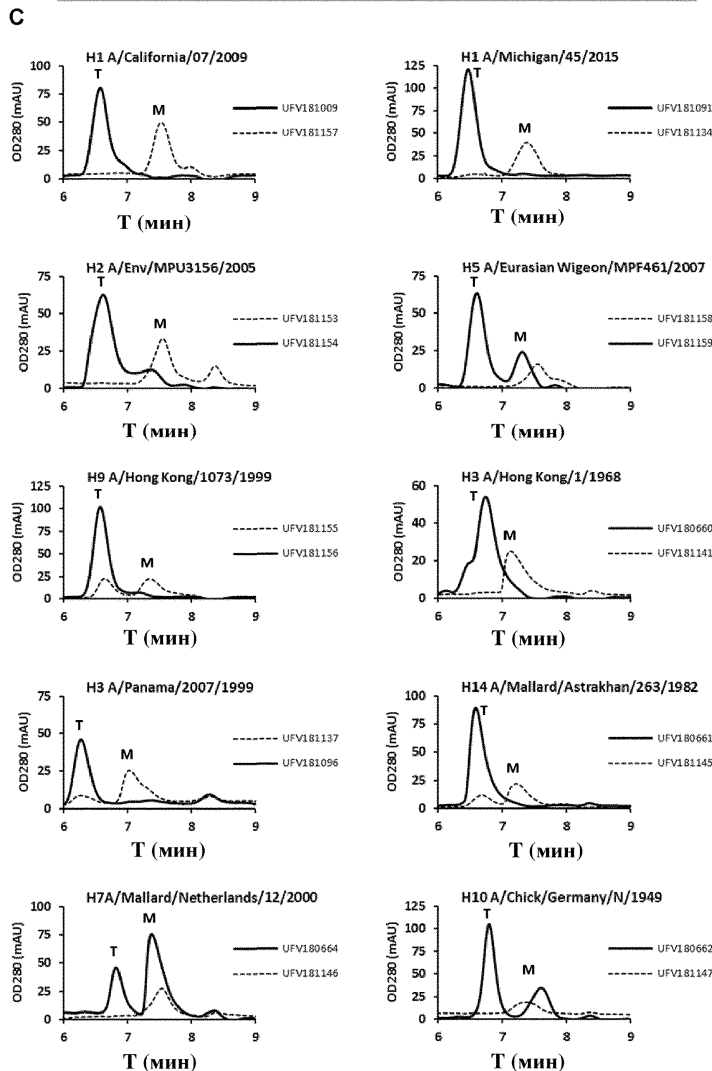
8. Полипептид НА по любому из пп.1-7, содержащий метку для выявления и/или очистки, расположенную на С-конце (усеченного) домена НА2.
9. Иммуногенный фрагмент полипептида по любому из пп.1-8.
10. Мультимерный полипептид, содержащий по меньшей мере два полипептида НА по любому из пп.1-8 или иммуногенный фрагмент по п.9.
11. Мультимерный полипептид по п.10, где полипептид является тримерным и содержит три полипептида НА по любому из пп.1-8.
12. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид НА по любому из пп.1-8, 10 или 11 или иммуногенный фрагмент по п.9.
13. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.12.
14. Вектор по п.13, где вектор представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор.
15. Способ получения рекомбинантного полипептида НА по любому из пп.1-8, 10 или 11 или иммуногенного фрагмента по п.9, включающий экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по п.12 в прокардиотической или эукардиотической клетке, причем указанный способ включает стадию выделения полипептида НА или его фрагмента из указанной клетки.
16. Иммуногенная композиция, содержащая полипептид НА по любому из пп.1-8, 10 или 11, иммуногенный фрагмент по п.9, нуклеиновую кислоту по п.12 и/или вектор по п.13 или 14 и фармацевтически приемлемый носитель.
17. Применение полипептида НА по любому из пп.1-8, 10 или 11 в индукции иммунного ответа против вируса гриппа.
18. Применение иммуногенного фрагмента по п.9 в индукции иммунного ответа против вируса гриппа.
19. Применение нуклеиновой кислоты по п.12 в индукции иммунного ответа против вируса гриппа.
20. Применение полипептида НА по любому из пп.1-8, 10 или 11 в качестве вакцины.
21. Применение иммуногенного фрагмента по п.9 в качестве вакцины.
22. Применение нуклеиновой кислоты по п.12 в качестве вакцины.



Фиг. 1

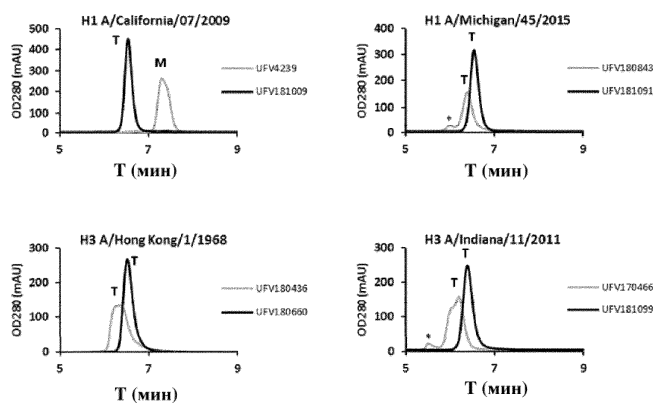


HA	Штамм	ID белка WT	Экспрессия (мг/л)	ID стабилизированного белка	Экспрессия (мг/л)	Кратное повышение
H1	A/California/07/2009	UFV181157	80	UFV181009	143	1,8
H1	A/Michigan/45/2015	UFV181134	83	UFV181091	225	2,7
H2	A/Env/MPU3156/2005	UFV181153	63	UFV181154	271	4,3
H5	A/Eurasian Wigeon/MPF461/2007	UFV181158	42	UFV181159	263	6,4
H9	A/Hong Kong/1073/1999	UFV181155	111	UFV181156	197	1,8
H3	A/Hong Kong/1/1968	UFV181141	58	UFV180660	138	2,4
H3	A/Panama/2007/1999	UFV181137	65	UFV181096	92	1,4
H14	A/Mallard/Astrakhan/263/1982	UFV181145	79	UFV180661	130	1,6
H7	A/Mallard/Netherlands/12/2000	UFV181146	72	UFV180664	178	2,5
H10	A/Chicken/Germany/N/1949	UFV181147	44	UFV180662	158	3,6

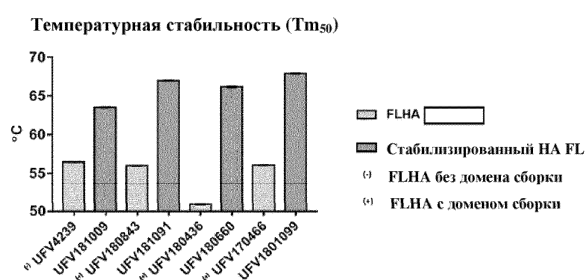


Фиг. 2

A



B

Температурная стабильность (T_{m50})

C

HA	Штамм	HA FL + домен сборки	T_{m50} (°C)	ID стабилизированного белка	T_{m50} (°C)
H1	A/California/07/2009	UFV4239 (мономер)	56,5	UFV181009	63,5
H1	A/Michigan/45/2015	UFV180843	60,0	UFV181091	67,0
H3	A/Hong Kong/1/1968	UFV180436	50,9	UFV180660	66,2
H3	A/Indiana/11/2011	UFV170466	47,8, 56,1*	UFV181099	67,9

* двухфазная точка плавления

D

Штамм	Связывание по ELISA (EC_{50} , нМ), N = 2				
	CR6261	CR8020	CR9114	CT149	MD3606
H1 A/California/07/2009					
UFV4239*	1,0 ± 0,1	>70	1,3 ± 0,2	1,6 ± 1,0	1,1 ± 0,1
UFV181009 [#]	1,8 ± 0,2	>70	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1
H1 A/Michigan/45/2015					
UFV180843	0,6 ± 0,1	>70	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
UFV181091*	1,3 ± 0,2	>70	1,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1
H3 A/Hong Kong/1/1968					
UFV180436	>70	1,6 ± 0,1	12,7 ± 3,5	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
UFV180660 [#]	>70	1,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1
H3 A/Indiana/11/2011					
UFV170466	>70	1,9 ± 0,1	25,0	0,7 ± 0,5	0,8 ± 0,1
UFV181099 [#]	>70	1,7 ± 0,4	2,8 ± 1,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1

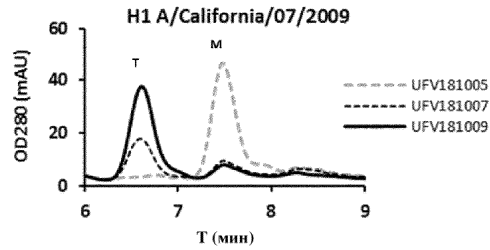
* Мономерный полипептид, # стабилизированный тримерный полипептид

Фиг. 3

A

355	478	380	432	ID.	Экспрессия (мг/л)
Н	М	К	Е	H1 A/California/07/2009	80
W	I	.	.	UFV181005	130
.	.	I	I	UFV181007	71
W	I	I	I	UFV181009	143

B

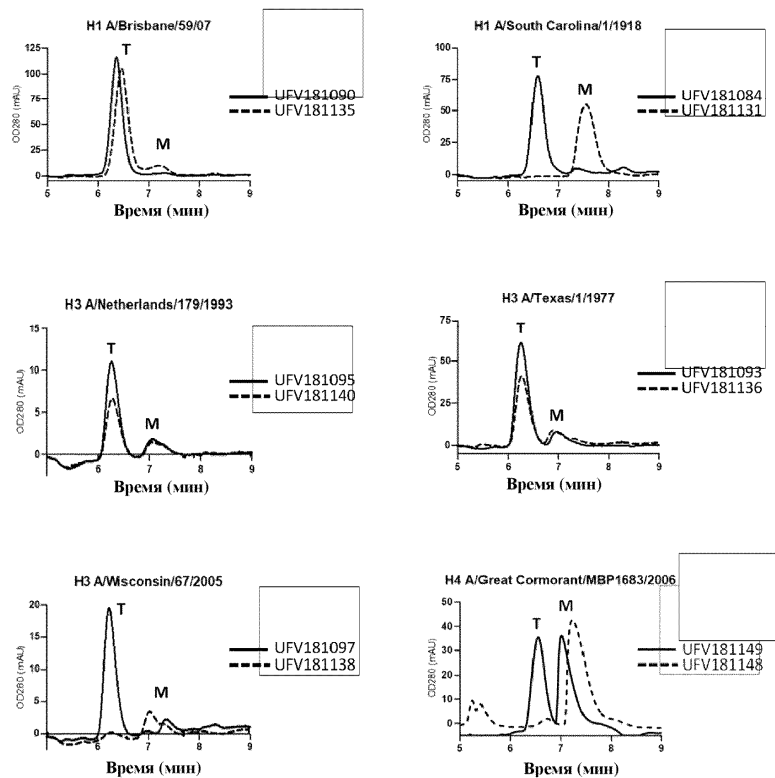


Фиг. 4

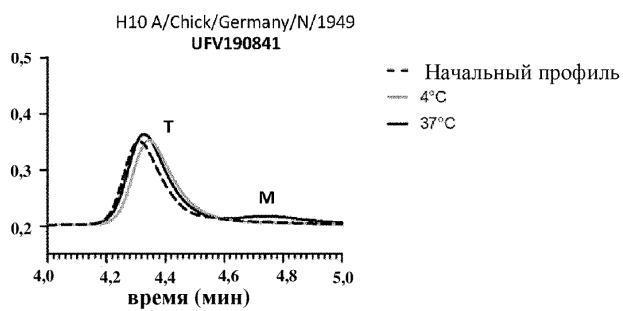
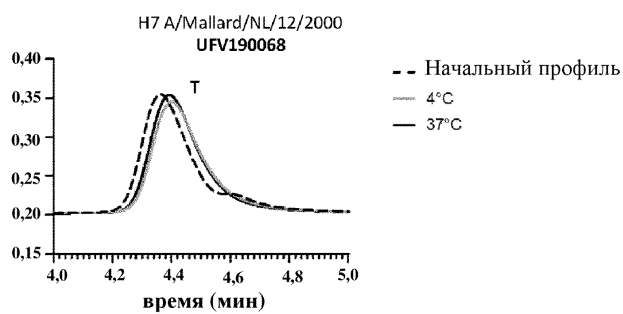
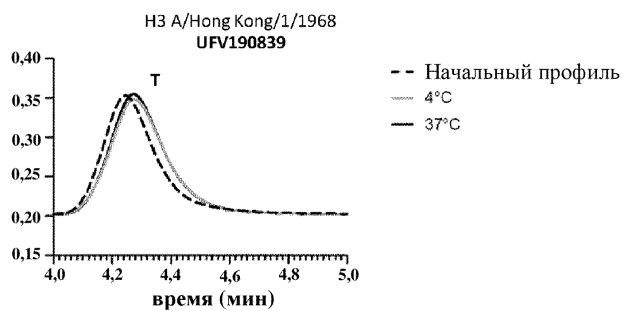
A

HA	Штамм	ID белка дикого типа	Экспрессия (мг/л)	ID стабилизированного белка	Экспрессия (мг/л)	Кратное повышение
H1	A/Brisbane/59/07	UFV181135	147	UFV181090	180	1,2
H1	A/South Carolina/1/1918	UFV181131	175	UFV181084	130	0,7
H3	A/Netherlands/179/1993	UFV181140	14	UFV181095	23	1,6
H3	A/Texas/1/1977	UFV181136	71	UFV181093	133	1,9
H3	A/Wisconsin/67/2005	UFV181138	13	UFV181097	34	2,6
H4	A/Great Cormorant/MBP1683/2006	UFV181148	129	UFV181149	223	1,7

B



Фиг. 5



Фиг. 6

