

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035375**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.03

(21) Номер заявки
201692467

(22) Дата подачи заявки
2015.07.09

(51) Int. Cl. **C07K 14/11** (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **14176459.7; 62/062,754; 14195143.4;
15155761.8**

(32) **2014.07.10; 2014.10.10; 2014.11.27;
2015.02.19**

(33) **EP; US; EP; EP**

(43) **2017.05.31**

(86) **PCT/EP2015/065663**

(87) **WO 2016/005482 2016.01.14**

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

(72) Изобретатель:
**Импальяццо Антоньетта, Мейберг
Ян Вилем, Радошевич Катарина (NL),
Вагнер Мишель, Дин Чжаоцин (US)**

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

(56) Y. LU ET AL.: "Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 16 December 2013 (2013-12-16), XP055095011, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1308701110, page 129, right-hand column, paragraph 2

JACOB ATSMON ET AL.: "Safety and Immunogenicity of Multimeric-001-

a Novel Universal Influenza Vaccine", JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 32, no. 3, 9 February 2012 (2012-02-09), pages 595-603, XP035054835, ISSN: 1573-2592, DOI: 10.1007/510875-011-9632-5, the whole document

WO-A1-2013079473

V.V.A. MALLAJOSYULA ET AL.: "Influenza hemagglutinin stem-fragment immunogen elicits broadly neutralizing antibodies and confers heterologous protection", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 25, 24 June 2014 (2014-06-24), pages E2514-E2523, XP055158737, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1402766111, the whole document

GAYATHRI BOMMAKANTI ET AL.: "Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge", NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. PROCEEDINGS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, UNITED STATES, vol. 107, no. 31, 3 August 2010 (2010-08-03), pages 13701-13706, XP002675041, ISSN: 1091-6490, DOI: 10.1073/PNAS.1007465107 [retrieved on 2010-07-06], the whole document

EKIERT DAMIAN C. ET AL.: "Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 324, no. 5924, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 246-251, XP009144786, ISSN: 0036-8075, the whole document

(57) Изобретение относится к мультимерным полипептидам стеблевого домена гемагглютинирина вируса гриппа, способам получения полипептидов стеблевого домена гемагглютинирина, композициям, содержащим их, вакцинам, содержащим их, и способам их применения, в частности, в выявлении, профилактике и/или лечении гриппа.

B1**035375****035375****B1**

Введение

Настоящее изобретение относится к области медицины. В настоящем документе обеспечиваются полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, способы получения полипептидов стеблевого домена гемагглютинина, композиции, содержащие их, вакцины, содержащие их, и способы их применения, в частности, для выявления, предупреждения и/или лечения гриппа.

Предпосылки изобретения

Вирусы гриппа являются основными патогенами человека, вызывая респираторное заболевание (обычно называемое "грипп"), тяжесть которого варьирует в пределах от субклинической инфекции до первичной вирусной пневмонии, которая может привести к смерти. Клинические эффекты инфекции различаются в зависимости от вирулентности штамма гриппа и воздействия, истории болезни, возраста и иммунного статуса хозяина. По оценкам, ежегодно приблизительно 1 млрд человек во всем мире подвергается инфицированию вирусом гриппа, что вызывает тяжелую болезнь в 3-5 млн случаев и ориентировочно от 300000 до 500000 смертей, связанных с гриппом. Большую часть этих инфекций можно отнести к вирусам гриппа А, несущим подтипы H1 или H3 гемагглютинина, при меньшем вкладе вирусов гриппа В, и, следовательно, представителей всех трех включают в сезонную вакцину. Современная практика иммунизации основана на ранней идентификации циркулирующих вирусов гриппа для обеспечения своевременного получения эффективной сезонной противогриппозной вакцины. 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 рекомбинированным с увеличением распространения от человека к человеку, представляет собой значительную и реальную угрозу для глобального здравоохранения.

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

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

Известно, что антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, направлены главным образом к гемагглютинуину (HA). Гемагглютинин или HA представляет собой трехмерный 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 мембраны, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитозоль клетки. HA содержит крупный головной домен и меньший стеблевой домен. Прикрепление к вирусной мембране опосредуется С-концевой якорной последовательностью, соединенной со стеблевым доменом. Белок подвергается посттрансляционному расщеплению в определенной петле с получением двух полипептидов, HA1 и HA2 (полную последовательность называют HA0). Мембранно-дистальная головная область происходит в основном из HA1, а мембранно-проксимальная стеблевая область - главным образом из HA2 (фиг. 1).

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

Недавно полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, в которых отсутствует весь или фактически весь глобулярный головной домен гемагглютинина вируса гриппа, были описаны и применены для генерирования иммунного ответа на один или несколько консервативных эпитопов полипептида стеблевого домена. Полагают, что эпитопы полипептида стеблевого домена являются менее иммуногенными, чем высокоиммуногенные области глобулярного головного домена, поэтому отсутствие глобулярного головного домена в полипептиде стеблевого домена может обеспечить возможность развития иммунного ответа против одного или нескольких эпитопов полипептида стеблевого домена (Steel и соавт., 2010). Steel и соавт., таким образом, создали новую молекулу посредством делеции аминокислотных остатков 53-276 в HA1 штаммов A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) и A/Hong Kong/1968 (H3N2) из первичной последовательности HA и замещения их короткой гибкой линкерной последовательностью GGGG. Вакцинация мышей конструкцией H3 HK68 не приводила к извлечению антисывороток, которые бы перекрестно реагировали с HA группы 1. В дополнение, как показано в PCT/EP2012/073706, полипептиды стеблевого домена были весьма нестабильными и не принимали правильную конформацию, что доказано отсутствием связывания антител, которые, как было показано, связываются с консервативными эпитопами в стеблевой области.

В дополнение, Bommakanti и соавт. (2010) описали полипептид на основе HA2, содержащий аминокислотные остатки 1-172 из HA2, 7-аминокислотный линкер (GSAGSAG), аминокислотные остатки 7-46 из HA1, 6-аминокислотный линкер GSAGSA с последующими остатками 290-321 из HA1, с мутациями V297T, I300E, Y302T и C305T в HA1. В основе данной разработанной конструкции лежала последовательность HA H3 (A/Hong Kong/1968). Полипептид обеспечивал перекрестную защиту только от другого штамма вируса гриппа в пределах подтипа H3 (A/Phil/2/82), но не от подтипа H1 (A/PR/8/34). В более ранней статье Bommakanti и соавт. (2012) описана последовательность стеблевого домена на основе HA из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (H1NA0HA6). В этом полипептиде были подвергнуты делеции эквиваленты остатков 55-302 и выполнены мутации I311T, V314T, I316N, C319S, F406D, F409T и L416D. Полипептиды на основе как H3, так и HA, экспрессировались в *E. coli* и, следовательно, в них отсутствовали гликаны, которые являются частью встречающихся в природе белков HA. При экспрессии в *E. coli* полипептид извлекают в основном в виде высокомолекулярных агрегатов и незначительной мономерной фракции. Полипептид связывается с CR6261 с двумя выраженными константами диссоциации 9 и 0,2 мкМ. Авторы показали, что мыши могут выжить при контрольном заражении в 1 дозе LD90 гомологичным вирусом H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 после иммунизации (дважды с интервалом в 4 недели) с 20 мкг белка со 100 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства CpG7909. Авторы также описывают полипептиды, подвергнутые циркулярной пермутации, сравнимые с описанными выше для полипептидов, полученных из A/Hong Kong/1/1968. Эти полипептиды получены из HA H1N1 A/Puerto Rico/8/1934, H1N1 A/North Carolina/20/99 или H1N1 A/California/07/2009 и могут обеспечивать частичную защиту в модели легкого контрольного заражения (1 LD90) мышей с H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (т.е. в пределах одного и того же подтипа). Образцы сыворотки крови морских свинок, иммунизированных этими полипептидами, не проявляли выявляемых уровней нейтрализации при тестировании в анализе нейтрализации.

Совсем недавно Lu и соавт. (2013) также описали растворимые полипептиды стеблевого домена, полученные из HA H1N1 A/California/05/2009. В конечной разработанной конструкции эквиваленты остатков 54-303 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) были подвергнуты делеции (лидерная последовательность, остатки 1-17, также отсутствует) и в В-петлю белка были введены две мутации, т.е. F407D и L413D. Кроме того, полипептид содержал С-концевой тримеризационный домен (фолдон). В дополнение, были введены два межмономерных дисульфидных мостика, один в зоне тримерного домена фолдона и один в положениях 430 и 431. Полипептид продуцируется в бесклеточной системе на основе экстрактов *E. coli* (и поэтому в нем отсутствуют гликаны, которые являются частью встречающихся в природе белков HA) и извлекается в денатурированной форме, которую необходимо подвергнуть рефолдингу перед применением. Иммунологические данные или данные о защите от контрольного заражения гриппом не были показаны, поэтому иммуногенность и эффективность данного полипептида неизвестны.

В недавней статье Mallajosyula и соавт. (2014) также сообщается о полипептиде стеблевого домена. В этой разработанной конструкции, в основе которой лежит HA H1N1 A/Puerto Rico/8/1934, делеции подвергнута не только значительная часть последовательности HA1 (остатки 42-289, нумерация согласно SEQ ID NO: 1), но также значительная часть N- и С-концевых последовательностей HA2 (соответственно остатки 344-383 и 457-565). Упоминания заслуживает то, что в белках HA H3 подвергнутая делеции часть содержит эпитопы нейтрализующих антител широкого спектра действия, например CR8020 и CR8043. Полипептид в этом случае также содержит тримеризационный домен фолдон на С-конце и также продуцируется в *E. coli*, поэтому в нем отсутствуют гликаны, встречающиеся в природе на вирусном HA. Полипептид связывается с нейтрализующими антителами широкого спектра действия, такими как CR6261, F10 и F16v3. Полипептид также тестировали в модели контрольного заражения гриппом (1 LD90 H1N1 A/Puerto Rico/8/1934), и он мог защищать мышей от смерти. Эквивалентные полипептиды, полученные из HA H1N1 A/New Caledonia/20/1999 и H1N1 A/California/04/2009, также могли обеспечивать частичную защиту. Эквивалентный полипептид, полученный из H5N1 A/Viet Nam/1203/2004, давал лишь

ограниченную защиту в данной модели контрольного заражения. Более того, для контрольного заражения животных с относительно низкой вводимой дозой (1-2 LD₅₀) применяли только один штамм вируса гриппа, поэтому защита от нескольких штаммов вируса гриппа, необходимое требование для универсальной вакцины, не была установлена.

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

Краткое описание

В настоящем документе обеспечиваются полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа, способы получения полипептидов стеблевого домена, композиции, содержащие их, вакцины, содержащие их, и способы их применения.

В первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает новые иммуногенные мультимерные полипептиды, которые содержат стеблевой домен гемагглютиниона вируса гриппа и в которых отсутствует глобулярная головка, называемые полипептидами стеблевого домена гемагглютиниона (НА) вируса гриппа. Мультимерные полипептиды способны индуцировать иммунный ответ при введении субъекту, в частности субъекту-человеку. Полипептиды по настоящему изобретению представляют консервативные эпитопы мембранно-проксимального стеблевого домена молекулы НА иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, присутствующих в мембранно-дистальном головном домене. Для этого часть первичной последовательности белка НА0, образующую головной домен, удаляют, а оставшуюся аминокислотную последовательность повторно соединяют, непосредственно либо в некоторых вариантах осуществления посредством введения короткой гибкой линкерной последовательности ("линкера"), с восстановлением непрерывности аминокислотной цепи. Полученную последовательность дополнительно модифицируют путем введения специфических мутаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы НА0. Полипептиды не содержат полноразмерный НА1 и/или НА2 вируса гриппа.

Настоящее изобретение обеспечивает новые мультимерные полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа, где указанные мультимерные полипептиды содержат, по меньшей мере, первый и второй мономеры стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа, при этом каждый из первого и второго мономера содержит:

(а) домен НА1 гемагглютиниона вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент НА1, ковалентно соединенный с помощью линкерной последовательности из 0-50 аминокислотных остатков с С-концевым стеблевым сегментом НА1, где указанный С-концевой сегмент НА1 соединен с (b) доменом НА2 гемагглютиниона вируса гриппа, где указанный N-концевой сегмент НА1 содержит аминокислоты 1-х НА1, предпочтительно аминокислоты р-х НА1, и где С-концевой стеблевой сегмент НА1 содержит аминокислоты от у до С-концевой аминокислоты НА1, и

(с) где полипептид не содержит участок расщепления протеазами в месте сочленения между НА1 и НА2 и

(d) где первый мономер соединен с указанным вторым мономером с помощью дисульфидного мостика между аминокислотой в положении 411 первого мономера и аминокислотой в положении 419 второго мономера.

Согласно настоящему изобретению дисульфидный мостик, таким образом, образует ковалентную поперечную связь между отдельными мономерами в мультимере.

В определенных вариантах осуществления мультимерный полипептид является тримерным, т.е. содержит три мономера. Согласно настоящему изобретению каждый мономер соединен с другим мономером с помощью дисульфидного мостика между аминокислотой в положении 411 одного мономера и аминокислотой в положении 419 другого мономера. Следует отметить, что применяемая нумерация приводится относительно SEQ ID NO: 1. Специалист в данной области техники будет способен определить эквивалентные положения в других последовательностях НА.

В определенных вариантах осуществления домены НА1 и НА2 получены из подтипа вируса гриппа А, происходящего из филогенетической группы 1.

В определенных вариантах осуществления домены НА1 и НА2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего НА подтипа Н1.

В определенных вариантах осуществления х=аминокислота в положении 52 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине), р=аминокислота в положении 18 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине) и у=аминокислота в положении 321 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине). В определенных вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент НА1 содержит, таким образом, аминокислоты 1-52 НА1, и С-концевой стеблевой сегмент НА1 содержит аминокислоты от 321 до концевой (т.е. С-концевой аминокислоты НА1) НА1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления делеция в сегменте НА1 охватыва-

ет аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 53 до аминокислоты в положении 320 включительно. В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. В определенных вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 содержит, таким образом, аминокислоты 18-52 HA1, где р представляет собой первую аминокислоту зрелой молекулы HA (например, р=18 в случае SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, происходящего из филогенетической группы 2.

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего HA подтипа H3.

Мультимерные полипептиды по настоящему изобретению содержат, таким образом, по меньшей мере два мономера, при этом каждый мономер содержит домен HA1, при этом указанный домен HA1 содержит N-концевой сегмент HA1, соединенный непосредственно либо с помощью линкерной последовательности с С-концевым сегментом HA1, и домен HA2. В определенных вариантах осуществления N-концевая аминокислота домена HA2 непосредственно соединена с С-концевой аминокислотой С-концевого сегмента HA1.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат полный домен HA2, т.е. домен HA2, включающий в себя трансмембранный домен и внутриклеточную последовательность. В определенных вариантах осуществления домены HA2 мономеров были усечены. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению не содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность от положения 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529 или 530 (или эквивалентного ему) домена HA2 до С-конца домена HA2 была удалена.

Согласно настоящему изобретению С-концевая аминокислота С-концевого стеблевого сегмента HA1 соединена с N-концевой аминокислотой домена HA2 с образованием, таким образом, сочленения между доменами HA1 и HA2. Полипептиды по настоящему изобретению не содержат участок расщепления протеазами в месте сочленения между доменами HA1 и HA2. В определенных вариантах осуществления С-концевой аминокислотный остаток в С-концевом стеблевом сегменте HA1 (аминокислота 343 в SEQ ID NO: 1) представляет собой любую аминокислоту, отличную от аргинина (R) или лизина (K), предпочтительно глутамин (Q).

Мономеры стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа в иммуногенных полипептидах по настоящему изобретению являются существенно меньшими, чем HA0, предпочтительно в них отсутствует вся или фактически вся глобулярная головка HA. Предпочтительно иммуногенные мономеры имеют длину не более чем 360, предпочтительно не более чем 350, 340, 330, 320, 310, 305, 300, 295, 290, 285, 280, 275 или 270 аминокислот. В определенных вариантах осуществления иммуногенные полипептиды имеют длину от приблизительно 250 до приблизительно 350, предпочтительно от приблизительно 260 до приблизительно 340, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330.

Полипептиды по настоящему изобретению не содержат полноразмерный HA1.

В определенных вариантах осуществления полипептиды являются гликозилированными.

Согласно настоящему изобретению полипептиды дополнительно содержат одну или несколько дополнительных мутаций в домене HA1 и/или HA2 по сравнению с аминокислотной последовательностью HA дикого типа, в частности HA, который лежит в основе доменов HA1 и HA2.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат консервативные эпитопы стеблевого домена для перекрестно нейтрализующего вирусы группы 1 антитела CR6261 (описанного в WO2008/028946) и/или антитела CR9114 (описанного в WO2013/007770), антитела, способного к связыванию и нейтрализации вирусов гриппа А как группы 1, так и группы 2, а также вирусов гриппа В. Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения заключается в обеспечении полипептидов стеблевого домена HA, где указанные полипептиды стабильно представляют эпитопы антитела CR6261 и/или CR9114, как показано посредством связывания указанного антитела или антител с указанными полипептидами.

В определенных вариантах осуществления полипептиды не связываются с CR8020 и CR8057 (описанными в WO 2010/130636), которые являются моноклональными антителами, связывающимися только с вирусами гриппа H3. Полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа, обеспечиваемые в настоящем документе, подходят для применения в иммуногенных композициях (например, вакцинах), способных генерировать иммунные ответы против множества штаммов вируса гриппа А и/или В.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат консервативные эпитопы стеблевого домена для перекрестно нейтрализующего вирусы группы 2 антитела CR8020 (описанного в WO 2010/130636).

В определенных вариантах осуществления полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа способны генерировать иммунные ответы против штаммов вируса гриппа А филогенетической группы 1 и/или группы 2, в частности против штаммов вируса гриппа как филогенетической группы 1, так и группы 2. В одном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ против гомологичных штаммов вируса гриппа. В одном варианте осуществления полипептиды способны

генерировать иммунный ответ против гетерологичных штаммов вируса гриппа одного и того же и/или разных подтипов. В дополнительном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ против штаммов вируса гриппа как филогенетической группы 1, так и группы 2, а также штаммов вируса гриппа В.

Полипептиды согласно настоящему изобретению можно применять, например, в качестве самостоятельного средства терапии, и/или профилактики, и/или диагностики заболевания или состояния, вызываемого вирусом гриппа, в частности вирусом гриппа А из филогенетической группы 1 или 2 и/или вирусом гриппа В, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения, такими как (существующие или будущие) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа. В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуногенные полипептиды.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы индуцирования иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту полипептида и/или молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает иммуногенные композиции, содержащие полипептид и/или молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Иммуногенные композиции, обеспечиваемые в настоящем документе, могут находиться в любой форме, которая позволяет вводить композиции субъекту, например мышам, хорькам или людям. В конкретном варианте осуществления иммуногенные композиции подходят для введения человеку. Полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот и композиции можно применять в способах предупреждения и/или лечения заболевания, вызываемого вирусом гриппа, и/или для диагностических целей. Композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат вспомогательное средство или вводятся в комбинации с ним.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или иммуногенные композиции для применения в качестве вакцины. Настоящее изобретение, в частности, относится к иммуногенным полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для применения в качестве вакцины для предупреждения и/или лечения заболевания или состояния, вызываемого подтипом вируса гриппа А филогенетической группы 1 и/или 2 и/или вирусом гриппа В.

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

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана модель мономера НА в состоянии до слияния, представленная в виде нативного тримера. НА1 показан светло-серым, НА2 показан темно-серым. Указаны спираль А (важная часть эпитопа CR6261) и спираль CD (часть контактной поверхности тримера), как и петля, соединяющая эти элементы вторичной структуры. Также указаны С-конец НА1 и N-конец НА2. Пептид слияния расположен на N-конце НА2.

Фиг. 2 - результаты сэндвич-ELISA с применением CR9114 для:

- (А) очищенного растворимого НА H1N1 A/Brisbane/59/2007 в тримерной и мономерной формах;
- (В) среды, полученной из культур, экспрессирующих S127H1 (SEQ ID NO: 66), s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91); в целях сравнения также показаны данные для тримера и мономера FL HA;
- (С) вариантов 55G7-t2 с двойной мутацией замены на цистеин (SEQ ID NO: 166-176);
- (D) вариантов 127H1-t2 с двойной заменой на цистеин (SEQ ID NO: 177-187).

Фиг. 3 - вестерн-блоттинг среды из культур, экспрессирующих варианты 55G7 (А, В) и 127H1-t2 (С, D) с двойной заменой на цистеин, в восстанавливающих (А, С) и в невосстанавливающих условиях (В, D). Числа над каждой дорожкой относятся к кластеру мутаций замены на цистеин, как приведено в табл. 10.

Фиг. 4 - структурная модель полипептида по настоящему изобретению, в которой указаны положения остатков 411 и 419, подвергнутых мутации замены на цистеин в 127H1-t2-cl18. Данная модель создана посредством делеции остатков 53-320 в структуре полноразмерного НА H1N1 A/California/04/2009 (PDB 3LZG).

Фиг. 5А - профиль элюирования из колонки для препаративной эксклюзионной хроматографии (Superdex 200) в ходе очистки s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 181) с помощью дополнительной С-концевой His-метки. Фракции указаны под чертежом. Фиг. 5В - анализ фракций, собранных из колонки для эксклюзионной хроматографии, с помощью SDS-PAGE в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях. Числа над дорожками соответствуют фиг. 5А, М обозначает маркер молекулярного веса. Фиг. 5С - нативный PAGE фракций 1-4. Числа над дорожками соответствуют фиг. 5А, М обозначает маркер молекулярного веса. Фиг. 5D - вестерн-блоттинг фракций 1-4 с применением поликлонального антитела к His-метке для выявления. Числа над дорожками соответствуют фиг. 5А, М обозна-

чает маркер молекулярного веса.

Фиг. 6 - результаты ELISA для связывания нейтрализующих антител широкого спектра действия CR6261 и CR9114 с полипептидами во фракциях 1-4, указанных на фиг. 5. Также включено связывание с сывороточными поликлональными антителами к HA H1N1 и моноклональным антителом CR8020, специфичным к вирусам группы 2. В целях сравнения также показаны результаты для растворимого HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 в мономерной и тримерной формах.

Фиг. 7 - результаты сэндвич-ELISA с применением CR9114 для фракций 1-4, указанных на фиг. 5. В целях сравнения также показаны результаты для растворимого HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 в мономерной и тримерной формах.

Фиг. 8 - результаты SEC-MALS для полипептида из фракции 3 в отсутствие и в присутствии Fab-фрагментов CR8020 (на верхней панели), CR6261 или CR9114 (оба на нижней панели). Образование комплекса с Fab-фрагментами CR9114 и CR6261 приводит к увеличению молекулярной массы и сдвигу пика.

Фиг. 9 - связывание нейтрализующих антител широкого спектра действия CR6261 и CR9114 с s127H1-t2-cl18long, определенное с помощью бислойной интерферометрии. На А и С показаны отдельные кривые связывания для иммобилизованных моноклональных антител, подвергнутых воздействию различных концентраций s127H1-t2-cl18long; на В и D показан анализ стационарного состояния, применяемый для оценки K_d .

Фиг. 10А - выживаемость, фиг. 10В - относительная потеря веса тела и фиг. 10С - клинический показатель для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контролей. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (25×LD50) H1N1 A/Puerto Rico/8/34 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. Планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал В или межквартильный размах С.

Фиг. 11 - выживаемость для групп, иммунизированных 1 раз А, 2 раза В или 3 раза С 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-М. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (25×LD50) H1N1 A/Puerto Rico/8/34 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. В целях сравнения также показана группа отрицательного контроля (PBS).

Фиг. 12 - относительное изменение веса тела для групп, иммунизированных 1 раз (А), 2 раза (В) или 3 раза 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-М. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (25×LD50) H1N1 A/Puerto Rico/8/34 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. В целях сравнения также показана группа отрицательного контроля (PBS). Планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал.

Фиг. 13 - клинические показатели для групп, иммунизированных 1 раз А, 2 раза В или 3 раза 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-М. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (25×LD50) H1N1 A/Puerto Rico/8/34 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. В целях сравнения также показана группа отрицательного контроля (PBS). Планки погрешностей указывают на межквартильный размах.

Фиг. 14 - результаты ELISA для сыворотки крови до контрольного заражения (через 4 недели после заключительной иммунизации) в группах отрицательного контроля и экспериментальных группах с применением s127H1-t2-cl18long (А) или растворимой формы полноразмерного HA (В) в качестве антигена. Полосы представляют медианное значение.

Фиг. 15 - антитела, индуцированные через 4 недели после заключительной иммунизации (в момент времени до контрольного заражения), после иммунизации полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-М способны конкурировать с CR9114 за связывание с полноразмерным HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в конкурентном ELISA (вверху). В целях сравнения на отдельном графике внизу показаны уровни конкуренции с моноклональными антителами немеченым CR9114 (т.е. самоконкуренции) и несвязывающим CR8020, оба из которых находятся в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл. Полосы представляют медианное значение.

Фиг. 16А - выживаемость для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контролей. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (12,5×LD50) H5N1 A/Hong Kong/156/97 через четыре недели после последней иммунизации. Фиг. 16В - выживаемость, фиг. 16С - относительное изменение веса тела и фиг. 16D - медианные клинические показатели для группы, иммунизированной 3 раза 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-М. Планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал С или межквартильный размах D. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (12,5×LD50) H5N1 A/Hong Kong/156/97 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. В целях сравнения на В, С, D также показана группа отрицательного контроля (PBS).

Фиг. 17 - результаты ELISA для образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных 3 раза

полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению согласно описанному в примере 7, с применением полноразмерных НА из ряда штаммов вируса гриппа группы 1 (H1, H5 и H9) и группы II (H3 и H7) в качестве антигена.

Фиг. 18А - выживаемость для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контролей. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой ($12,5 \times LD_{50}$) H1N1 A/Brisbane/59/2007 через четыре недели после последней иммунизации. Фиг. 18В - выживаемость, фиг. 18С - относительное изменение веса тела и фиг. 18D - медианные клинические показатели для группы, иммунизированной 3 раза 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-M. Планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал С или межквартильный размах D. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой ($12,5 \times LD_{50}$) H1N1 A/Brisbane/59/2007 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. В целях сравнения на В, С, D также показана группа отрицательного контроля (PBS).

Фиг. 19 - анализ нейтрализации псевдочастиц с применением образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению или PBS. Для сыворотки крови животных, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению, нейтрализацию наблюдают при высоких сыровоточных концентрациях.

Фиг. 20 - анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в модели. Образцы сыворотки крови мышей, иммунизированных полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению, проявляют 30-40-кратную индукцию активности передачи сигналов через FcγRIV при наиболее высоких сыровоточных концентрациях при применении клеток-мишеней, трансфицированных FL НА H5N1 A/Hong Kong/156/97 (А) или H1N1 A/Brisbane/59/07 (В), в качестве источника антигена.

Фиг. 21А - сэндвич-ELISA с применением CR9114 для выявления мультимерных форм полипептидов по настоящему изобретению (указанных по их SEQ ID NO). Культуральную среду разводили с 3-кратным шагом и анализировали. Фиг. 21В - связывание CR9114 с полипептидами по настоящему изобретению (указанными по их SEQ ID NO), выявляемое посредством ELISA. Культуральную среду разводили с 3-кратным шагом и анализировали. Фиг. 21С - связывание CR6261 с полипептидами по настоящему изобретению (указанными по их SEQ ID NO), выявляемое посредством ELISA. Культуральную среду разводили с 3-кратным шагом и анализировали. Фиг. 21D - связывание CR8020 с полипептидами по настоящему изобретению (указанными по их SEQ ID NO), выявляемое посредством ELISA. Культуральную среду разводили с 3-кратным шагом и анализировали. Для очищенных белков (SEQ ID NO: 186 и полноразмерного НА в тримерной и мономерной формах) применяли исходную концентрацию 5 мкг/мл. Все полипептиды содержат С-концевую последовательность His-метки, расщепляемую фактором X.

Фиг. 22 - вестерн-блоттинг надосадочной жидкости культур, экспрессирующих полипептиды по настоящему изобретению (указанные по их SEQ ID NO). В восстанавливающих условиях межмономерные дисульфидные мостики восстанавливаются, и полипептиды по настоящему изобретению являются мономерными в геле (левая панель). В окислительных условиях межмономерные дисульфидные мостики остаются в неизменном состоянии, и полипептиды по настоящему изобретению обнаруживаются в геле в виде тримеров. В случае SEQ ID NO: 186 в данном эксперименте применяли очищенный тример.

Фиг. 23 - титры сыровоточного IgG, определенные посредством ELISA (полноразмерный НА в качестве антигена), полученные после иммунизации NHP согласно описанному в примере 16. НА на панелях А-F получены из штаммов вируса гриппа группы 1 (определенных на панелях), НА на панелях G-J получены из штаммов вируса гриппа группы 2. Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения.

Фиг. 24 - конкурентное связывание с сыровоточным IgG и CR9114, полученное после иммунизации NHP согласно описанному в примере 16. Применяли FL НА из 3 различных штаммов, как определено на панелях А-С. Показанные данные представляют собой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах.

Фиг. 25 - активность ADCC в модели, определенная с применением эффекторных клеток для биологического анализа ADCC в сыворотке крови, полученной после иммунизации NHP согласно описанному в примере 16. Применяли клетки, трансфицированные ДНК, экспрессирующей FL НА из 3 различных штаммов (определенных на панелях А-С). Данные выражены в виде кратности индукции, которая представляет собой сигнал в каждом измерении по сравнению с фоновым сигналом в отсутствие сыворотки крови. Линии обозначают отдельных животных, символы обозначают среднее значение для двух повторностей на каждую сыровоточную концентрацию.

Фиг. 26 - анализ микронейтрализации с применением сыворотки крови, полученной после иммунизации NHP согласно описанному в примере 16. Считывание показаний представляло собой основанную на ELISA количественную оценку уровня NP в фиксированных клетках через 16 ч после инкубирования со 100 TCID₅₀ H5N1 A/HK/156/97 на лунку в присутствии сыворотки крови в серийном разведении. Ли-

нии обозначают отдельных животных, символы обозначают среднее значение для двух повторностей на каждую сывороточную концентрацию.

Фиг. 27 - площадь под кривой увеличения температуры приматов, отличных от человека, включенных в эксперимент, описанный в примере 16. Для каждого животного воссоздавали эталонный 24-часовой цикл изменения температуры тела с применением 21-дневного окна до начала иммунизаций. Чистое увеличение температуры тела в течение 21-дневного периода последующего наблюдения после контрольного заражения рассчитывали путем вычитания эталонной температуры тела с добавлением верхнего предела 95% CI из температуры тела, измеренной в течение периода последующего наблюдения после контрольного заражения. Затем рассчитывали AUC чистого увеличения температуры для интервалов из дней 0-3, дней 0-8 и дней 0-21. Статистический анализ обработок проводили с применением парного t-критерия с поправкой Тьюки-Крамера для множественных сравнений. Полосы обозначают медианное значение. Данные для животного J10014 (группа SEQ ID NO: 186+Matrix-M) не были получены по причине неисправности устройства регистрации данных. Животное J10403061 (группа инфлексала) умерло в конце дня 8 и было исключено из расчетов для интервала из дней 0-21.

Фиг. 28 - выживаемость A и % изменение веса тела B мышей после переливания сыворотки крови и контрольного заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97 согласно описанному в примере 17.

Фиг. 29 - титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей-доноров (D) в день 70 и мышей-реципиентов (R) до переливания сыворотки крови (день -4) или контрольного заражения (день 0). Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения.

Фиг. 30. Выживаемость A и % изменение веса тела B мышей после иммунизации и контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/2007 согласно описанному в примере 18.

Фиг. 31A - титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 18. Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения. B: конкурентное связывание с сывороточным IgG и CR9114, полученное после иммунизации мышей согласно описанному в примере 18. В качестве антигена применяли FL HA H1N1 A/Brisbane/59/2007. Показанные данные представляют собой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах.

Фиг. 32 - выживаемость A и % изменение веса тела B мышей после иммунизации и контрольного заражения H1N1 A/Netherlands/602/09 согласно описанному в примере 19.

Фиг. 33A - титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 19. Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения. B: конкурентное связывание с сывороточным IgG и CR9114, полученное после иммунизации мышей согласно описанному в примере 19. В качестве антигена применяли FL HA H1N1 A/Brisbane/59/2007. Показанные данные представляют собой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах.

Фиг. 34 - выживаемость A и % изменение веса тела B мышей после иммунизации и контрольного заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97 согласно описанному в примере 20.

Фиг. 35A - титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 20. Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения. Фиг. 35B - конкурентное связывание с сывороточным IgG и CR9114, полученное после иммунизации мышей согласно описанному в примере 20. В качестве антигена применяли FL HA H1N1 A/Brisbane/59/2007. Показанные данные представляют собой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах.

Фиг. 36 - выживаемость A и % изменение веса тела B мышей после иммунизации и контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34 согласно описанному в примере 21.

Фиг. 37A - титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 21. Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения. B: конкурентное связывание с сывороточным IgG и CR9114, полученное после иммунизации мышей согласно описанному в примере 21. В качестве антигена применяли FL HA H1N1 A/Brisbane/59/2007. Показанные данные представляют собой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах.

Фиг. 38 - вестерн-блоттинг (с применением поликлонального антитела к H1) надосадочной жидкости культуры клеток Hek293F после транзientной трансфекции полипептидами по настоящему изобретению.

Определения

Ниже даны определения терминов, используемых в настоящем изобретении.

Аминокислота согласно настоящему изобретению может представлять собой любую из двадцати встречающихся в природе (или "стандартных") аминокислот или их вариантов, таких как, например, D-пролин (D-энантиомер пролина), или любые варианты, которые не обнаруживаются в природе в белках, такие как, например, норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают особыми свойствами, например цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который образует цикл с полипептидным каркасом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В табл. 1 представлены аббревиатуры и свойства стандартных аминокислот.

Термин "идентичность аминокислотных последовательностей" относится к степени идентичности или сходства между парой выровненных аминокислотных последовательностей, как правило, выраженной в виде процентного значения. Процент идентичности представляет собой процентное значение аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые являются идентичными (т.е. аминокислотный остаток в данном положении в выравнивании является таким же остатком) или сходными (т.е. аминокислотная замена в данном положении в выравнивании представляет собой консервативную замену, обсуждаемую ниже) с соответствующим аминокислотным остатком в пептиде после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента гомологии последовательностей. Гомологию последовательностей, в том числе процентные значения идентичности и сходства последовательностей, определяют с применением методик выравнивания последовательностей, хорошо известных из уровня техники, например, путем визуального осмотра и математических расчетов или более предпочтительно сравнение осуществляют путем сравнения информации о последовательностях с помощью компьютерной программы. Иллюстративной предпочтительной компьютерной программой является разработанная Genetics Computer Group (GCG; Мэдисон, Висконсин) программа "GAP" версии 10.0 пакета Wisconsin (Devereux и соавт. (1984)).

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

Используемые в настоящем документе термины "заболевание" и "нарушение" используют взаимозаменяемо по отношению к состоянию субъекта. В некоторых вариантах осуществления состояние представляет собой вирусную инфекцию, в частности гриппозную вирусную инфекцию. В конкретных вариантах осуществления термин "заболевание" относится к патологическому состоянию, обусловленному наличием вируса в клетке или субъекте или инвазией вируса в клетку или субъекта. В определенных вариантах осуществления состояние представляет собой заболевание у субъекта, тяжесть которого уменьшают путем индуцирования иммунного ответа у субъекта посредством введения иммуногенной композиции.

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" применительно к введению терапевтического средства субъекту относится к количеству терапевтического средства, которое имеет профилактический(профилактические) и/или терапевтический(терапевтические) эффект(эффекты). В определенных вариантах осуществления "эффективное количество" применительно к введению терапевтического средства субъекту относится к количеству терапевтического средства, которое является достаточным для достижения снижения или облегчения тяжести гриппозной вирусной инфекции, заболевания или симптома, ассоциированного с ней, такого как, без ограничений, снижение продолжительности гриппозной вирусной инфекции, заболевания или симптома, ассоциированного с ней, предупреждение прогрессирования гриппозной вирусной инфекции, заболевания или симптома, ассоциированного с ней, предупреждение развития, или начала проявления, или рецидива гриппозной вирусной инфекции, заболевания или симптома, ассоциированного с ней, предупреждение или снижение распространения вируса гриппа от одного субъекта к другому субъекту, снижение частоты госпитализации субъекта и/или длительности госпитализации, увеличение выживаемости субъекта с гриппозной вирусной инфекцией или заболеванием, ассоциированным с ней, устранение гриппозной вирусной инфекции или заболевания, ассоциированного с ней, ингибирование или уменьшение репликации вируса гриппа, уменьшение титра вируса гриппа и/или усиление и/или улучшение профилактического(профилактических) или терапевтического(терапевтических) эффекта(эффектов) другого терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления эффективное количество не приводит к полной защите от заболевания, вызываемого вирусом гриппа, но приводит к снижению титра или уменьшению количества вирусов гриппа по сравнению с необработанным субъектом. Преимущества уменьшения титра, количества или общей нагрузки

вируса гриппа включают, без ограничений, меньшую тяжесть симптомов инфекции, меньшее количество симптомов инфекции и уменьшение длительности заболевания, ассоциированного с инфекцией.

Используемый в настоящем документе термин "хозяин" предназначен для обозначения организма или клетки, в которые был введен вектор, такой как клонирующий вектор или вектор экспрессии. Организм или клетка могут быть прокариотическими или эукариотическими. Предпочтительно хозяин включает выделенные клетки-хозяева, например клетки-хозяева в культуре. Термин "клетки-хозяева" означает лишь то, что клетки модифицированы для (сверх)экспрессии полипептидов по настоящему изобретению. Следует понимать, что термин "хозяин" предназначен для обозначения не только конкретного рассматриваемого организма или клетки, но также и потомства такого организма или клетки. Поскольку вследствие мутации либо влияний окружающей среды в последующих поколениях могут иметь место определенные модификации, такое потомство может в действительности не быть идентичным родительскому организму или клетке, но все еще быть включенным в объем термина "хозяин", используемого в настоящем документе.

Полагают, что после термина "включенный" или "включая", используемого в настоящем документе, должны следовать слова "без ограничения".

Используемый в настоящем документе термин "инфекция" означает инвазию, размножение и/или наличие вируса в клетке или субъекте. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой "активную" инфекцию, т.е. такую, при которой вирус реплицируется в клетке или субъекте. 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 субъекте или инвазией вируса в клетку или субъекта.

Вирусы гриппа классифицируют на типы вируса гриппа: роды А, В и С. Термин "подтип вируса гриппа", используемый в настоящем документе, относится к вариантам вируса гриппа А, которые характеризуются комбинациями поверхностных белков вируса гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). Согласно настоящему изобретению подтипы вируса гриппа могут быть названы по их номеру Н, как, например, "вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3", "вирус гриппа подтипа Н3" или "вирус гриппа Н3", или по комбинации номера Н и номера N, как, например, "подтип Н3N2 вируса гриппа" или "Н3N2". Термин "подтип" включает, в частности, все отдельные "штаммы" в пределах каждого подтипа, которые, как правило, образуются в результате мутаций и характеризуются различными патогенными профилями, 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 настоящем документе термины "штаммы" и "изоляты" можно использовать взаимозаменяемо. Существующая номенклатура штаммов или изолятов вируса гриппа человека включает тип (род) вируса, т.е. А, В или С, географическое место первого выделения, номер штамма и год выделения, обычно с описанием антигенов НА и NA, приведенным в скобках, например А/Moscow/10/00 (Н3N2). Штаммы, отличные от человеческих, также включают в свою номенклатуру хозяина, из которого они происходят. Подтипы вируса гриппа А можно дополнительно классифицировать путем ссылки на их филогенетическую группу. Филогенетический анализ продемонстрировал подразделение гемагглютининов на две основные группы: подтипы Н1, Н2, Н5 и Н9 *inter alia* в филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1") и подтипы Н3, Н4, Н7 и Н10 *inter alia* в филогенетической группе 2 (вирусы гриппа "группы 2").

Используемый в настоящем документе термин "заболевание, вызываемое вирусом гриппа" относится к патологическому состоянию, обусловленному наличием вируса гриппа, например вируса гриппа А или В, в клетке или субъекте или инвазией вируса гриппа в клетку или субъекта. В конкретных вариантах осуществления данный термин относится к респираторной болезни, вызываемой вирусом гриппа.

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

тических средств, гибридизационных зондов и праймеров для ПЦР.

Применяемая в настоящем документе в определенных вариантах осуществления нумерация аминокислот в НА основана на нумерации аминокислот в НА0 вируса гриппа дикого типа, например нумерации аминокислот в штамме вируса гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Используемая в настоящем изобретении формулировка "аминокислота в положении "х" в НА", таким образом, означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении х в НА0 конкретного вируса гриппа дикого типа, например A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1; где аминокислоты домена НА2 были указаны курсивом). Специалисту в данной области техники будет понятно, что путем множественного выравнивания последовательностей можно определить эквивалентные аминокислоты в других штаммах и/или подтипах вируса гриппа. Необходимо отметить, что в системе нумерации, применяемой во всей настоящей заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого белка НА0 (SEQ ID NO: 1). Зрелая последовательность начинается, например, с положения 18 SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области техники будет понятно, что лидерная последовательность (или сигнальная последовательность), которая определяет направление транспорта белка в ходе продуцирования (например, соответствующая аминокислотам 1-17 SEQ ID NO: 1), обычно отсутствует в конечном полипептиде, который, например, применяют в вакцине. В определенных вариантах осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению, таким образом, содержат аминокислотную последовательность без лидерной последовательности, т.е. в основе этой аминокислотной последовательности лежит аминокислотная последовательность НА0 без сигнальной последовательности.

"Полипептид" относится к полимеру аминокислот, соединенных амидными связями, как известно специалисту в данной области техники. Данный термин, используемый в настоящем документе, может означать одну полипептидную цепь, соединенную с помощью ковалентных амидных связей. Данный термин может также означать несколько полипептидных цепей, связанных с помощью нековалентных взаимодействий, таких как ионные контакты, водородные связи, ван-дер-ваальсовы контакты и гидрофобные контакты. Специалистам в данной области техники будет понятно, что данный термин включает полипептиды, которые были модифицированы, например, путем посттрансляционного процессинга, такого как отщепление сигнального пептида, образование дисульфидных связей, гликозилирование (например, N-сцепленное и O-сцепленное гликозилирование), расщепление протеазой и липидная модификация (например, S-пальмитоилирование).

"Полипептид стеблевого домена" относится к полипептиду, который содержит одну или несколько полипептидных цепей, образующих стеблевой домен встречающегося в природе (или дикого типа) гемагглютиниона (НА). Как правило, полипептид стеблевого домена представляет собой одну полипептидную цепь (т.е. соответствует стеблевому домену полипептидного гемагглютиниона НА0) или две полипептидные цепи (т.е. соответствует стеблевому домену полипептидного гемагглютиниона НА1, связанного с полипептидным гемагглютинином НА2). Согласно настоящему изобретению полипептид стеблевого домена содержит одну или несколько мутаций по сравнению с молекулой НА дикого типа, в частности один или несколько аминокислотных остатков НА дикого типа могут быть заменены другими аминокислотами, которые не встречаются в природе в соответствующем положении в конкретном НА дикого типа. Полипептиды стеблевого домена согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать одну или несколько линкерных последовательностей, как описано ниже.

Термин "вектор" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена вторая молекула нуклеиновой кислоты для введения хозяину, где она будет реплицироваться и в некоторых случаях экспрессироваться. Другими словами, вектор способен транспортировать молекулу нуклеиновой кислоты, к которой он был присоединен. Используемый в настоящем документе термин "вектор" охватывает клонирующие векторы, а также векторы экспрессии. Векторы включают, без ограничений, плазмиды, космиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC) и искусственные хромосомы дрожжей (YAC), а также векторы, полученные из бактериофагов или вирусов растений или животных (в том числе человека). Векторы содержат точку начала репликации, распознаваемую предполагаемым хозяином, и, в случае векторов экспрессии, промоторные и другие регуляторные области, распознаваемые хозяином. Определенные векторы способны к автономной репликации в хозяине, которому они введены (например, векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, могут реплицироваться в бактериях). Другие векторы можно встроить в геном хозяина после введения хозяину, и они, таким образом, реплицируются наряду с геномом хозяина.

Используемый в настоящем документе термин "дикого типа" применительно к вирусу относится к вирусам гриппа, которые являются преобладающими, циркулируют в естественных условиях и вызывают типичные вспышки заболевания.

Подробное описание

Вирусы гриппа имеют значительное влияние на глобальное здравоохранение населения, вызывая миллионы случаев тяжелой болезни каждый год, тысячи смертей и значительные экономические потери. Существующие трехвалентные противогриппозные вакцины вызывают сильный ответ с образованием нейтрализующих антител к вакцинным штаммам и близкородственным изолятам, который, однако, редко распространяется на более отличающиеся штаммы в пределах подтипа или на другие подтипы. В до-

полнение, выбор соответствующих вакцинных штаммов представляет много сложностей и часто приводит к недостаточной защите. Более того, прогнозирование подтипа следующего пандемического вируса, в том числе того, когда и где он появится, в настоящее время 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 инициирует слияние вирусной и эндосомальной мембран с высвобождением вирусного генома в цитоплазму клетки-мишени. НА содержит крупный эктодомен из ~500 аминокислот, который расщепляется ферментами хозяина с образованием 2 полипептидов, остающихся соединенными дисульфидной связью. Большая часть N-концевого фрагмента (НА1, 320-330 аминокислот) образует мембранно-дистальный глобулярный домен, который содержит рецептор-связывающий участок и большинство детерминант, распознаваемых антителами, нейтрализующими вирус. Меньшая С-концевая часть (НА2, ~180 аминокислот) образует стеблеподобную структуру, которая заякоривает глобулярный домен на клеточной или вирусной мембране. Степень гомологии последовательности между подтипами является меньшей для полипептидов НА1 (34-59% гомология между подтипами), чем для полипептидов НА2 (51-80% гомология). Наиболее консервативная область представляет собой последовательность вблизи участка расщепления, в частности 23 N-концевые аминокислоты НА2, которые являются консервативными среди всех подтипов вируса гриппа А (Logieau и соавт., 2010). Часть этой области доступна в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице НА (НА0), но становится недоступной после расщепления НА0 на НА1 и НА2.

Большинство нейтрализующих антител связываются с петлями, которые окружают рецептор-связывающий участок, и препятствуют связыванию с рецептором и прикреплению. Так как эти петли являются высоковариабельными, большинство антител, нацеленных на эти области, являются штаммоспецифическими, что объясняет то, почему существующие вакцины вызывают выработку такого ограниченного штаммоспецифического иммунитета. Недавно, однако, были созданы полностью человеческие моноклональные антитела к гемагглютинину вируса гриппа с широким спектром перекрестно-нейтрализующей активности. Функциональный и структурный анализ выявил, что эти антитела препятствуют процессу слияния мембран и направлены к высококонсервативным эпитопам в стеблевом домене белка НА вируса гриппа (Throsby и соавт., 2008; Ekiert и соавт., 2009, WO 2008/028946, WO2010/130636, WO 2013/007770).

Полипептиды стеблевого домена, стабильно представляющие эпитопы этих антител, описаны в одновременно находящейся на рассмотрении заявке на патент РСТ/ЕР2012/073706. По меньшей мере, некоторые из полипептидов стеблевого домена, описанных в настоящем документе, стабильно представляют эпитоп CR6261 и/или CR9114 и являются иммуногенными у мышей. Дополнительные иммуногенные полипептиды стеблевого домена, стабильно представляющие эпитоп CR6261 и/или CR9114, были описаны в одновременно находящейся на рассмотрении заявке на патент РСТ/ЕР2014/060997.

Согласно настоящему изобретению были разработаны новые мультимерные полипептиды стеблевого домена НА, представляющие эти эпитопы. Эти полипептиды можно применять для создания универсальной эпитопной вакцины, индуцирующей защиту от широкого круга штаммов вируса гриппа. Как и в ранее описанных полипептидах стеблевого домена, высоковариабельную и иммунодоминантную часть, т.е. головной домен, сначала удаляют из полноразмерной молекулы НА для создания полипептида стеблевого домена, также называемого mini-НА, чтобы перенаправить иммунный ответ на стеблевой домен, где расположены эпитопы нейтрализующих антител широкого спектра действия. Нейтрализующие антитела широкого спектра действия, упомянутые выше, применяли для подтверждения наличия нейтрализующих эпитопов.

В определенных вариантах осуществления новые стеблевые полипептиды НА по настоящему изобретению образуют стабильные тримеры в растворе, оставляя при этом доступными эпитопы нейтрализующих антител CR6261, и/или CR9114, и/или CR8020. Дополнительные взаимодействия между отдельными мономерами дополнительно стабилизируют белок и эпитопы, что приводит к лучшему представлению этих эпитопов, когда полипептиды применяют в вакцине.

Полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению способны представлять консервативные эпитопы мембранно-проксимального стеблевого домена молекулы НА иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, присутствующих в мембранно-дистальном головном домене. Для этого часть первичной последовательности белка НА0, образующую головной домен, удаляют и повторно соединяют, непосредственно либо в некоторых вариантах осуществления посредством введения короткой гибкой линкерной последовательности ("линкера"), с восстановлением непрерывности полипептидной цепи. Полученную полипептидную последовательность дополнительно модифицируют путем введения специфических мутаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы НА0.

Настоящее изобретение обеспечивает новые мультимерные полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, где указанные мультимерные полипептиды содержат, по меньшей мере,

первый и второй мономеры стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, при этом каждый из первого и второго мономера содержит: (а) домен HA1 гемагглютинина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно соединенный с помощью линкерной последовательности из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1, где указанный C-концевой сегмент HA1 соединен с (b) доменом HA2 гемагглютинина вируса гриппа, где указанный N-концевой сегмент HA1 содержит аминокислоты 1-х HA1, предпочтительно аминокислоты р-х HA1, и где C-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислоты от у до C-концевой аминокислоты HA1; и

(с) где полипептид не содержит участок расщепления протеазами в месте сочленения между доменами HA1 и HA2; и

(d) где первый мономер соединен с указанным вторым мономером с помощью дисульфидного мостика между аминокислотой в положении 411 первого мономера и аминокислотой в положении 419 второго мономера.

Согласно настоящему изобретению дисульфидный мостик, таким образом, образует ковалентную поперечную связь между отдельными мономерами в мультимере.

В определенных вариантах осуществления мультимерный полипептид является тримерным, т.е. содержит три мономера стеблевого домена вируса гриппа. Согласно настоящему изобретению каждый мономер соединен с другим мономером с помощью дисульфидного мостика между аминокислотой в положении 411 одного мономера и аминокислотой в положении 419 другого мономера.

Согласно настоящему изобретению неожиданно было обнаружено, что введение нового дисульфидного мостика между положениями аминокислот 411 и 419 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1 или эквивалентным остаткам гемагглютинина других вирусов гриппа) по меньшей мере двух различных мономеров приводит к получению димерного или предпочтительно тримерного полипептида. В отличие от других опубликованных тримерных стеблевых структур HA, этот тример с межмономерными дисульфидными связями хорошо экспрессируется и спонтанно сворачивается. Таким образом, для достижения его трехмерной структуры не требуются процедуры рефолдинга, как было описано (Lu и соавт., 2013).

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, происходящего из филогенетической группы 1.

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего HA подтипа H1. Полипептиды по настоящему изобретению не содержат полноразмерный HA1.

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, происходящего из филогенетической группы 2.

В определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего HA подтипа H3.

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

Согласно настоящему изобретению "N-концевой сегмент HA1" относится к полипептидному сегменту, который соответствует аминоконцевой части домена HA1 молекулы гемагглютинина (HA) вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления N-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты от положения 1 до положения х домена HA1, где аминокислота в положении х представляет собой аминокислотный остаток в пределах HA1. Термин "C-концевой сегмент HA1" относится к полипептидному сегменту, который соответствует карбоксиконцевой части домена HA1 гемагглютинина вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления C-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты от положения у до C-концевой аминокислоты домена HA1 включительно, где аминокислота в положении у представляет собой аминокислотный остаток в пределах HA1. Согласно настоящему изобретению у больше, чем х, и ввиду этого сегмент домена HA1 между N-концевым сегментом HA1 и C-концевым сегментом HA1, т.е. между аминокислотой в положении х и аминокислотой в положении у HA1, был подвергнут делеции и в некоторых вариантах осуществления замещен линкерной последовательностью.

В определенных вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислоты 1-х HA1, а C-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислоты от у до концевой HA1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления делеция в сегменте HA1 охватывает аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении х+1 до аминокислоты в положении у-1 включительно.

В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. Таким образом, в определенных вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 содержит аминокислоты р-х HA1, где р представляет собой первую аминокислоту зрелой молекулы HA (например,

p=18 в случае SEQ ID NO: 1). Специалист в данной области техники сможет получить полипептиды, описанные в настоящем документе, без сигнальных пептидов (например, аминокислот 1-17 SEQ ID NO: 1).

Снова необходимо отметить, что нумерация положений аминокислот, применяемая в настоящем документе, относится к SEQ ID NO: 1. Специалист в данной области техники будет способен определить эквивалентные положения в других последовательностях гемагглютинина.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат полный домен HA2, соответствующий включающий в себя трансмембранную и внутриклеточную последовательности. В других вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению не содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат усеченный домен HA2. В определенных вариантах осуществления внутриклеточная и трансмембранная последовательность, например аминокислотная последовательность от положения 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529 или 530 (или эквивалентного ему) домена HA2 до С-конца домена HA2, была удалена для продуцирования растворимого полипептида после экспрессии в клетке.

Согласно настоящему изобретению полипептиды стеблевого домена гемагглютинина являются устойчивыми к расщеплению протеазами в месте сочленения между доменами HA1 и HA2, т.е. не содержат участок расщепления протеазами в этом месте сочленения между HA1 и HA2. Специалистам в данной области техники известно, что последовательность Arg (R)-Gly (G), объединяющая HA1 и HA2, представляет собой участок распознавания для трипсина и трипсиноподобных протеаз и, как правило, расщепляется для активации гемагглютинина. Поскольку полипептиды стеблевого домена HA, описанные в настоящем документе, не должны быть активированы, полипептиды стеблевого домена гемагглютинина по настоящему изобретению являются устойчивыми к расщеплению протеазами. Согласно настоящему изобретению, таким образом, участок расщепления протеазами удаляют или участок для протеаз, объединяющий HA1 и HA2, подвергают мутации с получением последовательности, которая является устойчивой к расщеплению протеазами. Согласно настоящему изобретению удаления участка расщепления между HA1 и HA2 можно достичь посредством мутации замены R (в небольшом количестве случаев K) на Q в положении P1 (см., например, Sun и соавт., 2010, для пояснения номенклатуры участка расщепления (положение 343 в SEQ ID NO: 1)). В определенных вариантах осуществления С-концевой аминокислотный остаток в С-концевом стеблевом сегменте HA1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от аргинина (R) или лизина (K). В определенных вариантах осуществления С-концевая аминокислота в HA1 представляет собой глутамин (Q), серин (S), треонин (T), аспарагин (N), аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E). В определенных вариантах осуществления С-концевой аминокислотный остаток в С-концевом стеблевом сегменте HA1 представляет собой глутамин (Q).

В определенных вариантах осуществления полипептиды являются гликозилированными.

В определенных вариантах осуществления в основе полипептидов стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа лежит HA вирусов гриппа подтипа H1. Под выражением "лежит в основе" следует понимать, что N-концевые сегменты и/или С-концевые сегменты домена HA1 и/или домена HA2 обладают по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности с соответствующими N-концевыми и/или С-концевыми сегментами доменов HA1 и/или HA2 любого встречающегося в природе гемагглютинина вируса гриппа подтипа H1, известного специалистам в данной области техники или обнаруженного позже.

В определенных вариантах осуществления в основе полипептидов лежит HA H1, т.е. HA, содержащий аминокислотную последовательность вируса гриппа подтипа H1, в частности вируса гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 1), как описано ниже. Специалисту в данной области техники будет понятно, что также и другие вирусы гриппа А, содержащие HA подтипа H1, можно применять в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат стеблевые домены гемагглютинина на основе HA вируса гриппа А H1, выбранного из табл. 2.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат N-концевой полипептидный сегмент HA1, содержащий аминокислоты от положения 1 до положения x домена HA1 H1, где x представляет собой любую аминокислоту между аминокислотой в положении 46 и аминокислотой в положении 60, такую как аминокислота в положении 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 59, где x предпочтительно составляет 52, 53, 55 или 59. Предпочтительно полипептиды содержат N-концевой сегмент HA1 без сигнальной последовательности, т.е. N-концевой сегмент HA1, содержащий аминокислоты от положения 18 (например, для HA H1, такого как SEQ ID NO: 1) или эквивалентного положения в других штаммах вируса гриппа (см., например, табл. 2) до положения x домена HA1. В определенных вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 содержит, таким образом, аминокислоты от положения p (где p=18 для HA H1 в SEQ ID NO: 1 или эквивалентное положение в других HA H1) до положения x домена HA1.

В определенных вариантах осуществления С-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты от положения y до С-концевой аминокислоты домена HA1 H1 включительно, где y пред-

ставляет собой любую аминокислоту между аминокислотой в положении 290 и аминокислотой в положении 325 HA1 H1, где у предпочтительно составляет 291, 303, 318 или 321.

В определенных вариантах осуществления x =аминокислота в положении 52 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине), p =аминокислота в положении 18 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине) и y =аминокислота в положении 321 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине). В определенных вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит, таким образом, аминокислоты 1-52 HA1, и C-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислоты от 321 до концевой (т.е. C-концевой аминокислоты HA1) HA1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления делеция в сегменте HA1 охватывает аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 53 до аминокислоты в положении 320 включительно. В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. В определенных вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 содержит, таким образом, аминокислоты 18-52 HA1, где p представляет собой первую аминокислоту зрелой молекулы HA (например, $p=18$ в случае SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит, таким образом, аминокислотные остатки 1-52 HA1, предпочтительно аминокислотные остатки 18-52 HA1, и C-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислотные остатки 321-343 HA1. В определенных вариантах осуществления N-концевой стеблевой сегмент HA1 состоит из аминокислотных остатков 1-52 HA1, предпочтительно из аминокислотных остатков 18-52 HA1, и C-концевой стеблевой сегмент HA1 состоит из аминокислотных остатков 321-343 HA1.

Согласно настоящему изобретению стеблевые полипептиды содержат одну или несколько мутаций, т.е. аминокислотных замен, в домене HA1 и/или домене HA2 отдельных мономеров по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующих доменов HA1 и/или HA2 вируса гриппа дикого типа, т.е. вируса гриппа, который лежит в основе стеблевых полипептидов.

В определенных вариантах осуществления домен HA2 содержит одну или несколько мутаций в аминокислотной последовательности HA2, соединяющей C-концевой остаток спирали A с N-концевым остатком спирали CD (фиг. 1). Аминокислотная последовательность HA2 H1, соединяющая C-концевой остаток спирали A и N-концевой остаток спирали CD, содержит аминокислотную последовательность, содержащую остатки 402-418 HA вируса гриппа (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), которая включает в себя аминокислотную последовательность MNTQFTAVGKEFN(H/K)LE(K/R) (SEQ ID NO: 7).

В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность, соединяющая C-концевой остаток спирали A с N-концевым остатком CD-спирали, т.е. область, содержащая аминокислотные остатки 402-418 HA вируса гриппа серотипа H1 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), содержит аминокислотную последовательность $X_1NTQX_2TAX_3GKEX_4N(H/K)X_5E(K/R)$ (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в положениях 402, 406, 409, 413 и 416 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1), т.е. одна или несколько аминокислот X_1 , X_2 , X_3 , X_4 и X_5 , были подвергнуты мутации, т.е. включают в себя аминокислоту, которая не встречается в этих положениях в вирусе гриппа дикого типа, который лежит в основе стеблевого полипептида.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота в положении 402, т.е. X_1 , представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R и T.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота в положении 406, т.е. X_2 , представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, T, H, L и Y, предпочтительно I, L или Y.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота в положении 409, т.е. X_3 , представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V, A, G, I, R, F и S, предпочтительно A, I или F.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота в положении 413, т.е. X_4 , представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, E, K, M и V, предпочтительно I, Y, M или V.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота в положении 416, т.е. X_5 , представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L, H, I, N, R, предпочтительно I.

Также возможны комбинации из одной или нескольких этих мутаций.

В определенных вариантах осуществления X_1 представляет собой M, X_2 представляет собой Y, X_3 представляет собой I, X_4 представляет собой Y и X_5 представляет собой S.

Согласно настоящему изобретению стеблевые полипептиды содержат одну или несколько дополнительных мутаций, т.е. аминокислотных замен, в домене HA1 и/или домене HA2 по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующих доменов HA1 и/или HA2 вируса гриппа дикого типа, т.е. вируса гриппа, который лежит в основе стеблевых полипептидов.

В определенных вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков рядом с участком расщепления HA0 (остаток 343 в SEQ ID NO: 1) были подвергнуты мутации. В определенных вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков в положениях 337, 340, 352 или 353 в SEQ ID NO: 1 или эквивалентных положениях в других вирусах гриппа были подвергнуты мута-

ции, т.е. заменены аминокислотой, которая не встречается в соответствующем положении в аминокислотной последовательности HA вируса гриппа дикого типа, который лежит в основе стеблевого полипептида. В табл. 6 показана встречающаяся в природе аминокислотная изменчивость.

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

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

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

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

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления при мутации аминокислоты в последовательность вводится консенсусный участок для N-гликозилирования, например, N-X-T/S (где X представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту, за исключением P), как это, например, имеет место в случае I340N в SEQ ID NO: 6.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота представляет собой аминокислоту, которая не встречается в природе в последовательностях из того же подтипа.

В определенных вариантах осуществления мутировавший аминокислотный остаток в положении 337 (домен HA1) представляет собой K.

В определенных вариантах осуществления мутировавший аминокислотный остаток в положении 340 (домен HA1) представляет собой K.

В определенных вариантах осуществления мутировавший аминокислотный остаток в положении 352 (домен HA2) представляет собой F.

В определенных вариантах осуществления мутировавший аминокислотный остаток в положении 353 (домен HA2) представляет собой T.

Снова необходимо отметить, что во всей настоящей заявке нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в HA0 H1, в частности на нумерации аминокислот в штамме вируса гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Специалист в данной области техники сможет определить эквивалентные аминокислоты в HA из других вирусов гриппа и таким образом будет иметь возможность определить эквивалентные мутации, см., например, табл. 2 для выравнивания последовательностей различных вирусов гриппа H1.

Согласно настоящему изобретению полипептиды могут дополнительно содержать дополнительный дисульфидный мостик между аминокислотой в положении 324 и аминокислотой в положении 436. Таким образом, согласно настоящему изобретению в полипептиды стеблевого домена был введен по меньшей мере один дополнительный дисульфидный мостик, предпочтительно между аминокислотами в положениях 324 и 436 (или эквивалентных им) в H1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления полипептиды, таким образом, дополнительно содержат мутацию R324C в домене HA1 и T436C в домене HA2. Специалисты в данной области техники могут легко определить эквивалентные положения путем выравнивания последовательностей с помощью подходящего алгоритма, такого как Clustal, MUSCLE и т.д. Сконструированные дисульфидные мостики создают посредством мутации замены на цистеин по меньшей мере одного (если другой уже является цистеином), но обычно двух остатков, являющихся пространственно близкими, которые будут спонтанно или путем активного окисления образовывать ковалентную связь между атомами серы этих остатков.

В определенных вариантах осуществления в основе полипептидов стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа лежит HA вирусов гриппа подтипа H3. Под выражением "лежит в основе" следует понимать, что N-концевые сегменты и/или C-концевые сегменты домена HA1 и/или домена HA2 обладают по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности с соответствующими N-концевыми и/или C-концевыми сегментами доменов HA1 и/или HA2 любого встречающегося в природе гемагглютинина вируса гриппа подтипа H3, известного специалистам в данной области техники или обнаруженного позже.

В определенных вариантах осуществления в основе полипептидов лежит HA H3, т.е. HA, содержащий аминокислотную последовательность вируса гриппа из вируса H3N2 A/Hong Kong/1/1968 (SEQ ID NO: 237), как описано ниже. Специалисту в данной области техники будет понятно, что также и другие вирусы гриппа А, содержащие HA подтипа H3, можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 193) введена в положения 419-433 SEQ ID NO: 1 (или в эквивалентные положения в других HA) или аминокислотная последовательность RMCQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 194) введена в положения 417-433 SEQ ID NO: 1 (или в эквивалентные положения в других HA).

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды избирательно связываются с антителами CR6261 и/или CR9114. В одном варианте осуществления полипептид не связывается с антителами CR8020 и/или CR8057. В одном варианте осуществления CR6261 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CR9114 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления CR8057 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. CR8020 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В определенных вариантах осуществления полипептиды избирательно связываются с антителом CR8020.

Согласно настоящему изобретению, таким образом, в определенных вариантах осуществления обеспечиваются мультимерные полипептиды, которые имитируют специфические эпитопы CR6261, CR9114 и/или CR8020 и которые можно применять в качестве иммуногенных полипептидов, например, чтобы вызвать выработку перекрестно нейтрализующих антител при введении *in vivo* отдельно либо в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения. Под "перекрестно нейтрализующими антителами" подразумевают антитела, которые способны нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 1, и/или по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 2, и/или по меньшей мере два различных подтипа вирусов гриппа В, в частности, по меньшей мере, все штаммы вируса, нейтрализуемые с помощью CR6261 и CR9114.

Как описано выше, полипептиды содержат по меньшей мере два мономера, где каждый из указанных мономеров содержит домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно соединенный линкерной последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с С-концевым стеблевым сегментом HA1. Линкерная последовательность не встречается в HA, встречающемся в природе, или дикого типа. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой пептид, который содержит один аминокислотный остаток, два или менее аминокислотных остатков, три или менее аминокислотных остатков, четыре или менее аминокислотных остатков, пять или менее аминокислотных остатков, десять или менее аминокислотных остатков, 15 или менее аминокислотных остатков, или 20 или менее аминокислотных остатков, или 30 или менее аминокислотных остатков, или 40 или менее аминокислотных остатков, или 50 или менее аминокислотных остатков. В конкретном варианте осуществления линкерная последовательность представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из G, GS, GGG, GSG, GSA, GSGS, GSAG, GGGG, GSAGS, GSGSG, GSAGSA, GSAGSAG и GSGSGSG.

В определенных вариантах осуществления N-концевой сегмент HA1 непосредственно соединен с С-концевым сегментом HA1, т.е. полипептиды не содержат линкерную последовательность.

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления внутриклеточная и трансмембранная последовательности, например аминокислотная последовательность от положения 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529 или 530 (или эквивалентного ему) домена HA2 до С-конца домена HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) были удалены для продуцирования растворимого полипептида после экспрессии в клетках.

В определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2 от положения 519 до С-концевой аминокислоты была подвергнута делеции. В дополнительных вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2 от положения 530 до С-концевой аминокислоты была подвергнута делеции.

Необязательно, последовательность His-метки (НННННН (SEQ ID NO: 15) или ННННННН (SEQ ID NO: 16)), необязательно присоединяемую посредством линкера, можно соединить с (необязательно усеченным) доменом HA2 для целей очистки. Линкер необязательно может содержать участок протеолитического расщепления для ферментативного удаления His-метки после очистки.

В определенных вариантах осуществления полипептиды дополнительно стабилизируют путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), на С-конце HA2, необязательно присоединяемой посредством линкера. Таким образом, в определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2 была замещена аминокислотной последовательностью GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), необязательно присоединяемой посредством линкера. Линкер может необязательно содержать участок расщепления для последующего процессинга согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Для облегчения очистки растворимой формы можно добавить последовательность метки, например His-метку (ННННННН (SEQ ID NO: 15) или НННННН (SEQ ID NO: 16)) или FLAG-метку (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 22) или их комбинацию, необязательно присоединяемую посредством коротких линкеров. Линкер может необязательно содержать участок (часть участка) протеолитического расщепления, например IEGR (SEQ ID NO: 24) (фактор X) или LVPRGS (SEQ ID NO: 23) (тромбин), для последующего процессинга согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Процессированные белки также охватываются настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2 в положениях 519-565 была подвергнута делеции (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) и замещена на SGRDYKDDDDKLVPRG-SPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGННННННН (SEQ ID NO: 4).

В определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2 в положениях 530-565 была подвергнута делеции (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) и замещена на SGRDYKDDDDKLVPRG-SPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGННННННН (SEQ ID NO: 4).

Нативный HA существует в виде тримера на клеточной поверхности. Большинство взаимодействий между отдельными мономерами, которые удерживают их в тримере вместе, происходят в головном домене, тогда как в стеблевом домене тримеризация опосредована образованием тримерного суперспирального мотива. После удаления головки третичная структура дестабилизируется, и, следовательно, для увеличения стабильности белка необходимы модификации. Путем усиления склонности к спиралеобразованию у спирали CD можно создать более стабильный белок.

В полипептидах, описанных в одновременно находящейся на рассмотрении заявке РСТ/EP2014/060997, последовательность MKQIEDKIEEIESKQ (SEQ ID NO: 5), полученная из белка-активатора транскрипции дрожжей GCN4 и известная как тримеризующая, была введена в CD-спираль в положения 419-433 (или эквивалентные им). Данная последовательность обладает высокой склонностью к образованию спиральных вторичных структур и вследствие этого может повышать общую стабильность полипептидов по настоящему изобретению.

Было дополнительно показано, что стабильность и мултимеризованное состояние полипептида зависят от точного местоположения и последовательности для полученной из GCN4 последовательности в первичной последовательности полипептидов по настоящему изобретению.

В предпочтительных вариантах осуществления аминокислотная последовательность CMKQIED-KIEEIESK (SEQ ID NO: 193) введена в положения 419-433, или в них последовательность RMCQIED-KIEEIESKQK (SEQ ID NO: 194) введена в положения 417-433.

В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, полипептиды s74H9 (SEQ ID NO: 65), s127H1 (SEQ ID NO: 66), s71H2 (SEQ ID NO: 71), s86B4 (SEQ ID NO: 67), s115A1 (SEQ ID NO: 70), s220C9 (SEQ ID NO: 77), s55G7 (SEQ ID NO: 68), s113E7 (SEQ ID NO: 78), s6E12 (SEQ ID NO: 69), s181H9 (SEQ ID NO: 76) были модифицированы с помощью методик молекулярной биологии, хорошо известных специалистам в данной области техники, для создания последовательностей s74H9-t2 (SEQ ID NO: 93), s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91), s71H2-t2 (SEQ ID NO: 97), s86B4-t2 (SEQ ID NO: 92), s115A1-t2 (SEQ ID NO: 96), s220C9-t2 (SEQ ID NO: 99), s55G7-t2 (SEQ ID NO: 95), s113E7-t2 (SEQ ID NO: 100), s6E12-t2 (SEQ ID NO: 94), s181H9-t2 (SEQ ID NO: 98), содержащих последовательность RMKQIED-KIEEIESK (SEQ ID NO: 20) в положениях 419-433.

Подобным образом создавали полипептиды s74H9-t3 (SEQ ID NO: 123), s127H1-t3 (SEQ ID NO:

121), s71H2-t3 (SEQ ID NO: 127), s86B4-t3 (SEQ ID NO: 122), s115A1-t3 (SEQ ID NO: 126), s2201C9-t3 (SEQ ID NO: 129), s55G7-t3 (SEQ ID NO: 125), s113E7-t3 (SEQ ID NO: 130), s6E12-t3 (SEQ ID NO: 124), s181H9-t3 (SEQ ID NO: 128), содержащие последовательность RMKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) в положениях 417-433.

Согласно настоящему изобретению дисульфидный мостик между аминокислотой в положении 411 первого мономера и аминокислотой в положении 419 второго мономера был введен посредством мутации замены аминокислот в положениях 411 и 419 на цистеин. Таким образом, в определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 193) введена в положения 419-433, или аминокислотная последовательность RMCQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 194) введена в положения 417-433.

Как описано выше, заявители ранее идентифицировали нейтрализующие антитела широкого спектра действия, выделенные из первичных В-клеток человека от вакцинированных индивидуумов, при этом некоторые из них были специфичными для группы 1 (например, CR6261, описанное в WO 2008/028946), а некоторые из них были специфичными для группы 2 вирусов гриппа (например, CR8020, описанное в WO 2010/130636). Подробный анализ эпитопов этих моноклональных антител выявил причину отсутствия перекрестной реактивности этих специфичных антител. В обоих случаях наличие гликанов в различных положениях молекул HA группы 1 или группы 2, по меньшей мере, частично объясняло тот факт, что антитела являются группоспецифическими. После идентификации CR9114-подобных антител, которые перекрестно реагируют со многими молекулами HA группы 1 и 2, как описано ниже, стало ясно, что в иммунной системе человека можно вызвать выработку нейтрализующих антител очень широкого спектра действия к вирусам гриппа. Однако с учетом необходимости в схеме ежегодной вакцинации, выработка этих антител после инфицирования или вакцинации (сезонными) вирусами гриппа подтипов H1 и/или H3, по-видимому, не вызывается или вызывается лишь в очень низкой степени.

Согласно настоящему изобретению обеспечиваются мультимерные полипептиды, которые имитируют специфические эпитопы CR6261, и/или CR9114, и/или CR8020 и которые можно применять в качестве иммуногенных полипептидов, например, чтобы вызвать выработку перекрестно нейтрализующих антител при введении *in vivo* отдельно либо в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения.

Под "перекрестно нейтрализующими антителами" подразумевают антитела, которые способны нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 1, и/или по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 2, и/или по меньшей мере два различных подтипа вирусов гриппа В, в частности, по меньшей мере, все штаммы вируса, нейтрализуемые с помощью CR6261, и/или CR9114, и/или CR8020.

В определенных вариантах осуществления полипептиды избирательно связываются с антителами CR6261 и/или CR9114. В определенных вариантах осуществления полипептид не связывается с антителом CR8057. CR6261 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CR9114 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CR8020 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. CR8057 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению являются тримерными.

В определенных вариантах осуществления мономеры полипептидов содержат аминокислотную последовательность

DTICIGYHANNSTDVTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRN_{X1}P

SX₂QSQGLFGAIAGX₃X₄EGGWTGMVDGWYGHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKNVNSVI

EKK₅NTQX₆TAX₇GCEX₈NKX₉ERCМКQIEDKIEEIESKIWCYNAEELLVLENERLTDFHDSNVK

NLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMEVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVSGR
DYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHH (SEQ ID NO:

145),

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;
X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;
X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;
X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;
X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;
X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;

X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;
X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

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

В определенных вариантах осуществления мономеры полипептидов содержат аминокислотную последовательность

```
DTICIGYHANNSTDVTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVCSAKLRMTGLRNX1P
SX2QSQGLFGAIAAGX3X4EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKNVNSVI
EKX5NTQX6TAX7GCEX8NKX9ERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVK
NLYEKVKSQKLKNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDG
(SEQ ID NO: 146),
```

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;
X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;
X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;
X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;
X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;
X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;
X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;
X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

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

В определенных вариантах осуществления мономеры полипептидов содержат аминокислотную последовательность

```
DTICIGYHANNSTDVTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVCSAKLRMTGLRNX1P
SX2QSQGLFGAIAAGX3X4EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKNVNSVI
EKX5NTQX6TAX7GCEX8NKX9ERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVK
NLYEKVKSQKLKNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLE
SMGVYQIEG (SEQ ID NO: 147),
```

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;
X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;
X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;
X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;
X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;
X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;
X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;
X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

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

В определенных вариантах осуществления мономеры полипептидов содержат аминокислотную последовательность

```
DTICIGYHANNSTDVTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVCSAKLRMTGLRNX1P
SX2QSQGLFGAIAAGX3X4EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKNVNSVI
EKX5NTQX6TAX7GCEX8NKX9ERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVK
NLYEKVKSQKLKNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLE
SMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 148),
```

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;
X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;
X₃ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;
X₄ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;
X₅ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;
X₆ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;
X₇ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;
X₈ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K, M и V; и

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

В определенных вариантах осуществления X₁ представляет собой K, X₂ представляет собой K, X₃ представляет собой F, X₄ представляет собой T, X₅ представляет собой M, X₆ представляет собой Y, X₇ представляет собой I; X₈ представляет собой Y и X₉ представляет собой S.

Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа можно получить согласно любой методике, которая считается подходящей для специалиста в данной области техники, включая методики,

описанные ниже.

Таким образом, иммуногенные полипептиды по настоящему изобретению можно синтезировать в виде последовательностей ДНК с помощью стандартных способов, известных из уровня техники, и клонировать, а затем экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с применением подходящих ферментов рестрикции и способов, известных из уровня техники. Настоящее изобретение, таким образом, также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим описанные выше полипептиды. Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению является частью вектора, например плазмиды. С такими векторами можно легко производить манипуляции с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области техники, и их, например, можно разработать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. В дополнение, многие векторы можно непосредственно или в форме выделенного из них необходимого фрагмента применять для трансформации эукариотических клеток и интегрировать целиком или частично в геном таких клеток, получая стабильные клетки-хозяева, содержащие необходимую нуклеиновую кислоту в своем геноме. Применяемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно применять для транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. При применении клеток-хозяев предпочтительно, чтобы вектор представлял собой интегрирующий вектор. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой эписомально реплицирующийся вектор.

Специалист в данной области техники способен выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению функциональным образом. Специалистам в данной области техники хорошо известно, что для достижения экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, последовательности, способные управлять экспрессией, можно функционально связать с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, с получением рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих белок или полипептид в экспрессируемом формате. Как правило, промоторную последовательность помещают выше последовательностей, которые должны экспрессироваться. В данной области техники доступны многие векторы экспрессии, например серия векторов pcDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т.д., которые можно применять для получения подходящих промоторов и/или последовательностей терминаторов транскрипции, последовательностей поли-А и т.п. Если последовательность, кодирующая полипептид, представляющий интерес, вставлена надлежащим образом относительно последовательностей, регулирующих транскрипцию и трансляцию кодируемого полипептида, то полученная кассета экспрессии применима для продуцирования полипептида, представляющего интерес, что называется экспрессией. Последовательности, управляющие экспрессией, могут включать в себя промоторы, энхансеры и т.п., а также их комбинации. Они должны быть способными функционировать в клетке-хозяине, тем самым управляя экспрессией последовательностей нуклеиновых кислот, которые функционально связаны с ними. Специалист в данной области техники осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно применять различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получить из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или разрабатывать искусственным путем. Экспрессия нуклеиновых кислот, представляющих интерес, может происходить под управлением природного промотора или его производного или под управлением полностью гетерологичного промотора (Kaufman, 2000). Некоторые хорошо известные и наиболее часто применяемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как немедленно-ранний (IE) промотор CMV (называемый в настоящем документе промотором CMV) (получаемый, например, из pcDNA, Invitrogen), промоторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40) (Das и соавт., 1985), и т.п. Из эукариотических клеток также можно получить подходящие промоторы, такие как промоторы генов металлотронеинов (MT), промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1 α) (Gill и соавт., 2001), промотор гена убиквитина С или UB6 (Gill и соавт., 2001), промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов теплового шока и т.п. Тестирование промоторной функции и силы промотора является стандартной практикой для специалиста в данной области техники и, как правило, может, например, охватывать клонирование тестируемого гена, такого как ген lacZ, люциферазы, GFP и т.д., позади промоторной последовательности и тестирование экспрессии тестируемого гена. Разумеется, промоторы можно изменять посредством делеции, добавления, мутации последовательностей в них и тестировать на функциональность с обнаружением новых, ослабленных или улучшенных, промоторных последовательностей. Согласно настоящему изобретению сильные промоторы, которые дают высокие уровни транскрипции в выбранных эукариотических клетках, являются предпочтительными.

Конструкции можно вводить путем трансфекции в эукариотические клетки (например, клетки растений, грибов, дрожжей или животных) или приемлемые прокариотические системы экспрессии, такие как *E. coli*, с применением способов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых случаях приемлемую последовательность "метки" (такой как, например, без ограничений, His-, Muc-, Strep- или FLAG-метка) или полного белка (такого как, например, без ограничений, мальтозосвязывающий белок или глутатион-S-трансфераза) можно добавить к последовательностям по настоящему изобретению для обеспечения очистки и/или идентификации полипептидов из клеток или надосадочной жидкости. Необязательно можно включить последовательность, содержащую специфический участок протеолиза, для последующего удаления метки путем протеолитического расщепления.

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

Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из полипептидов и/или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Композиции предпочтительно представляют собой иммуногенные композиции. Композиции предпочтительно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель в используемых дозах и концентрациях не будет вызывать нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым его вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Термин "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному средству, наполнителю или инертной среде, с которыми вводят композицию. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина можно, например, использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Точный состав должен соответствовать способу введения. Полипептиды и/или молекулы нуклеиновых кислот предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора. Стерильные растворы получают путем стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, широко известных из уровня техники. Затем растворы можно лиофилизировать или наливать в контейнеры для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне pH от 3,0 до 9,5, например pH от 5,0 до 7,5.

Настоящее изобретение также относится к полипептидам стеблевого домена НА гриппа, молекулам нуклеиновых кислот и/или векторам, описанным выше, для применения в индукции иммунного ответа против белка НА вируса гриппа. Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции, описанных выше. Субъект согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой млекопитающее, которое способно инфицироваться возбудителем инфекционного заболевания, в частности вирусом гриппа, или может иным образом получить пользу от индукции иммунного ответа, при этом такой субъект, например, является грызуном, например мышью, хорьком, или домашним или сельскохозяйственным животным, или приматом, отличным от человека, или человеком. Субъект предпочтительно является субъектом-человеком. Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает способы индукции иммунного ответа на гемагглютинин (НА) вируса гриппа, в частности вируса гриппа А группы 1 и/или группы 2, такого как вирус гриппа, содержащий НА подтипа H1, H2, H3, H4, H5, H7 и/или H10, и/или вируса гриппа В, у субъекта с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы индукции иммунного ответа на вирус гриппа, содержащий НА подтипа H1, у субъекта с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления индуцируемый иммунный ответ является эффективным для предупреждения и/или лечения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой подтипами вируса гриппа А из группы 1 и/или группы 2 и/или вирусами гриппа В. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, индуцируемый полипептидами, нуклеиновыми кислотами и/или иммуногенными композициями, описанными в настоящем документе, является эффективным для предупреждения и/или лечения вызываемой вирусом гриппа А и/или В инфекции, вызываемой двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью подтипами вирусов гриппа А и/или В. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый иммунный ответ является эффективным для предупреждения и/или лечения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой вирусом гриппа, содержащим НА подтипа H1.

Поскольку хорошо известно, что небольшие белки и/или молекулы нуклеиновых кислот не всегда эффективно индуцируют сильный иммунный ответ, может быть необходимо увеличить иммуногенность полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот путем добавления вспомогательного средства. В опре-

деленных вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, содержат вспомогательное средство или вводятся в комбинации с ним. Вспомогательное средство для введения в комбинации с композицией, описанной в настоящем документе, можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения указанной композиции. Примеры подходящих вспомогательных средств включают в себя соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции масляных эмульсий (или композиции типа "масло в воде"), в том числе эмульсии сквалена в воде, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы на основе сапонины, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотив, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT *E. coli*, холерный токсин CT, коклюшный токсин PT или столбнячный анатоксин TT, Matrix M (Isconova). В дополнение, можно применять известные иммуностимулирующие технологии, такие как слияние полипептидов по настоящему изобретению с белками, известными из уровня техники как усиливающие иммунный ответ (например, со столбнячным анатоксином, CRM197, rCTB, бактериальными флагеллинами или другими), или включение полипептидов в виромеры, или их комбинации. Другими неограничивающими примерами, которые можно применять, являются, например, раскрытые Coffman и соавт. (2010).

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

В конкретном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению включен в виромер. Виромеру, содержащую полипептид согласно настоящему изобретению, можно получить с помощью методик, известных специалисту в данной области техники. Например, виромеру можно получить путем разрушения очищенного вируса, извлечения генома и повторной сборки частиц с вирусными белками (например, полипептидом стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа) и липидами с образованием липидных частиц, содержащих вирусные белки.

Настоящее изобретение также относится к описанным выше полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для индукции иммунного ответа у субъекта против НА вируса гриппа, в частности, для применения в качестве вакцины. Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды, или векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты или полипептиды, описанные в настоящем документе, таким образом, можно применять для того, чтобы вызвать выработку нейтрализующих антител к вирусам гриппа, например к стеблевой области гемагглютинина вируса гриппа. Настоящее изобретение, в частности, относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям, описанным выше, для применения в качестве вакцины для предупреждения и/или лечения заболевания или состояния, вызываемого вирусом гриппа А из филогенетической группы 1 и/или филогенетической группы 2 и/или вирусом гриппа В. В одном варианте осуществления вакцину можно применять для предупреждения и/или лечения заболеваний, вызываемых двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более различными подтипами из филогенетической группы 1 и/или 2 и/или вирусами гриппа В. В одном варианте осуществления вакцину можно применять для предупреждения и/или лечения гриппозной инфекции, вызываемой вирусом гриппа, содержащим НА подтипа H1.

Полипептиды по настоящему изобретению можно применять после синтеза *in vitro* или в подходящей клеточной системе экспрессии, в том числе в бактериальных и эукариотических клетках, или в качестве альтернативы можно экспрессировать *in vivo* в субъекте, нуждающемся в этом, путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуногенный полипептид. Такие вакцины на основе нуклеиновых кислот могут принимать любую форму, в том числе "голой" ДНК, плазмид или вирусных векторов, в том числе аденовирусных векторов.

Введение полипептидов, молекул нуклеиновых кислот, векторов и/или иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению можно выполнять с применением стандартных путей введения. Неограничивающие примеры включают в себя парентеральное введение, такое как внутривенное, внутрикожное, чрескожное, внутримышечное, подкожное и т.д., или введение через слизистую оболочку, например интраназальное, пероральное и т.п. Специалист в данной области техники будет способен определить различные возможности для введения полипептидов, молекул нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению с целью индукции иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную компози-

цию (или вакцину) вводят более чем один раз, т.е. в так называемом режиме гомологичного прайм-буста. В определенных вариантах осуществления, где полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию вводят более чем один раз, введение второй дозы можно выполнять через интервал времени, например в одну неделю или более после введения первой дозы, две недели или более после введения первой дозы, три недели или более после введения первой дозы, один месяц или более после введения первой дозы, шесть недель или более после введения первой дозы, два месяца или более после введения первой дозы, 3 месяца или более после введения первой дозы, 4 месяца или более после введения первой дозы и т.д., вплоть до нескольких лет после введения первой дозы полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции. Вакцину также можно вводить более двух раз, например три раза, четыре раза и т.д., так, чтобы за первым примирующим введением следовало более чем одно бустерное введение. В других вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, векторы и/или композицию согласно настоящему изобретению вводят только один раз.

Полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или композиции можно также вводить в качестве примирующей или в качестве бустерной вакцинации в режиме гетерологичного прайм-буста.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы предупреждения и/или лечения заболевания, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или композиций, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления способ предупреждения и/или лечения заболевания, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора и/или композиции, описанных выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, нуклеиновой кислоты и/или композиции, определенных в настоящем документе, которое является эффективным для предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания или состояния, обусловленного инфицированием вирусом гриппа А из группы 1 или 2 и/или вирусом гриппа В, предпочтительно заболевания, обусловленного инфицированием вирусом гриппа А, содержащим НА подтипа Н1, и/или вирусом гриппа А, содержащим НА подтипа Н3. Предупреждение охватывает ингибирование или снижение распространения вируса гриппа или ингибирование или ослабление начала проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфицированием вирусом гриппа. Применяемое в настоящем документе "облегчение" может относиться к ослаблению видимых или ощутимых симптомов заболевания, виремии или любых других поддающихся измерению проявлений гриппозной инфекции.

Нуждающиеся в лечении включают тех, которые уже имеют состояние, обусловленное инфицированием вирусом гриппа А из группы 1 или группы 2 или вирусом гриппа В, а также тех, у которых необходимо предупредить инфицирование вирусом гриппа. Полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или композиции по настоящему изобретению, таким образом, можно вводить ранее не получавшему вакцину субъекту, т.е. субъекту, который не имеет заболевания, вызываемого гриппозной вирусной инфекцией, или не был и в настоящее время не является инфицированным вирусом гриппа, или субъектам, которые уже являются и/или 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 ограничений, 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 и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но продемонстрировали неудовлетворительный противовирусный ответ.

В другом варианте осуществления полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы можно вводить субъекту в комбинации с одним или несколькими другими активными средствами, такими как существующие или будущие противогриппозные вакцины, моноклональные антитела и/или противовирусные средства и/или антибактериальные и/или иммуномодулирующие средства. Одно или несколько других активных средств 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.

Режимы дозирования полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно скорректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Подходящий диапазон доз может, например, составлять 0,1-100 мг/кг веса тела, предпочтительно 1-50 мг/кг веса тела, предпочтительно 0,5-15 мг/кг веса тела. Точная доза полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот, которые подлежат использованию, будет, например, зависеть от пути введения и серьезности инфекции или заболевания, вызываемого ей, и должна быть выбрана в соответствии с решением практикующего врача и состоянием каждого субъекта. Например, эффективные дозы варьируют в зависимости от участка-мишени, физиологического состояния пациента (в том числе возраста, массы тела, состояния здоровья) и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

Как правило, пациент является человеком, однако лечению также можно подвергать млекопитающих, отличных от человека, в том числе трансгенных млекопитающих. Для оптимизации безопасности и эффективности подбирают оптимальные лечебные дозы.

Полипептиды по настоящему изобретению также можно применять для проверки связывания моноклональных антител, идентифицированных в качестве потенциальных терапевтических средств-кандидатов. В дополнение, полипептиды по настоящему изобретению можно применять в качестве диагностического средства, например, для тестирования иммунного статуса индивидуума путем установления способности антител в сыворотке крови такого индивидуума к связыванию с полипептидом по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу диагностики *in vitro* для выявления наличия гриппозной инфекции у пациента, при этом указанный способ включает стадии а) приведения биологического образца, полученного из указанного пациента, в контакт с полипептидом согласно настоящему изобретению и б) выявления наличия комплексов антитело-антиген.

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

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

Примеры

Пример 1. Стеблевые полипептиды, раскрытые в РСТ/ЕР2014/060997.

В РСТ/ЕР2012/073706 раскрыты полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, композиции и вакцины на их основе, а также способы их применения в области предупреждения и/или лечения гриппа. В РСТ/ЕР2014/060997 раскрыты дополнительные последовательности полипептидов стеблевого домена, полученных из полноразмерного HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1), которые были получены посредством сайт-направленной мутации в H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) и которые стабильно представляли эпитоп нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR6261 (Throsby и соавт., 2009; Ekiert и соавт., 2010) и/или CR9114.

H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) был получен из полноразмерного HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1) посредством осуществления следующих стадий.

1. Удаление участка расщепления в HA0. Расщепление HA дикого типа в данном участке приводит к образованию HA1 и HA2. Удаления можно достичь посредством мутации замены R на Q в положении P1 (см., например, Sun и соавт., 2010 для пояснения номенклатуры участка расщепления (положение 343 в SEQ ID NO: 1)).

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

3. Увеличение растворимости петли (между А-спиралью и CD-спиралью), образованной остатками 402-418 (или их эквивалентами) в H1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1), для того, чтобы одновременно увеличить стабильность конформации до слияния и дестабилизировать конформацию после слияния модифицированного HA. В H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) вводили мутации F406S, V409T, F413G и L416S (нумерация относится к SEQ ID NO: 1).

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

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

В определенных вариантах осуществления последовательность трансмембранного и внутриклеточного домена была подвергнута делеции от положения 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 526, 527, 528, 529 или 530 (или эквивалентного ему, как определено по выравниванию последовательностей) HA2 до C-конца HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), так что после экспрессии в клетках продуцировался секретлируемый (растворимый) полипептид. Растворимый полипептид дополнительно стабилизировали путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. последовательности фолдона GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), необязательно присоединяемой посредством короткого линкера согласно описанному выше. Линкер может необязательно содержать участок расщепления для последующего процессинга согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Для облегчения очистки и выявления растворимой формы можно необязательно добавить последовательность метки, например гистидиновую метку (HHHHHHH (SEQ ID NO: 20) или HHHHHH (SEQ ID NO: 21)) или FLAG-метку (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 22) или их комбинацию, необязательно присоединяемую посредством коротких линкеров. Линкер может необязательно содержать участок (часть участка) протеолитического расщепления, например LVPRGS (SEQ ID NO: 23) (тромбин) или IEGR (SEQ ID NO: 24) (фактор X), для последующего процессинга согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Процессированные белки также охватываются настоящим изобретением.

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

Полипептиды стеблевого домена, таким образом, создавали посредством делеции части последовательности гемагглютинина, которая кодирует головной домен молекулы, и повторного соединения N- и С-концевой частей последовательности по обе стороны от места делеции посредством линкера согласно описанному в PCT/2012/073706 и выше. При удалении головного домена часть молекулы, которая была ранее защищена от водного растворителя, остается доступной для него, что потенциально дестабилизирует структуру полипептидов по настоящему изобретению. По этой причине остатки в В-петле (в частности, аминокислотные остатки 406 (F и S в SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно), 409 (V и T), 413 (F и G) и 416 (L и S)) подвергали мутации в различных комбинациях с применением исходной последовательности SEQ ID NO: 6 в качестве исходной точки. SEQ ID NO: 6 создавали из H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 2) путем удаления лидерной последовательности и замещения остатков 520-565 последовательностью FLAG-thrombin-foldon-His (SEQ ID NO: 4).

Подобным образом, в зоне вблизи пептида слияния ряд гидрофобных остатков является доступным для растворителя, что обусловлено тем фактом, что, в отличие от нативного полноразмерного НА, полипептиды по настоящему изобретению не могут расщепляться и подвергаются соответствующему конформационному изменению, при котором гидрофобный пептид слияния погружается во внутреннюю часть белка. Чтобы решить эту проблему, некоторые или все из остатков I337, I340, F352 и I353 в SEQ ID NO: 2 также подвергали мутации.

Таким образом создавали растворимые формы стеблевых полипептидов HA 74H9 (SEQ ID NO: 57), 127H1 (SEQ ID NO: 55), 71H2 (SEQ ID NO: 61), 86B4 (SEQ ID NO: 56), 115A1 (SEQ ID NO: 60), 2201C9 (SEQ ID NO: 63), 55G7 (SEQ ID NO: 59), 113E7 (SEQ ID NO: 64), 6E12 (SEQ ID NO: 58), 181H9 (SEQ ID NO: 62) в качестве части библиотеки.

Последовательности ДНК, кодирующие полипептиды, описанные выше, вводили путем трансформации в *Pichia pastoris* или вводили путем трансфекции в клетки HEK293F с применением протоколов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Конструкции, применяемые для экспрессии в клетках млекопитающих, содержали лидерную последовательность НА (остатки 1-17 в SEQ ID NO: 1 и 2), тогда как в конструкциях, применяемых для экспрессии в *P. pastoris*, лидерная последовательность НА была замещена лидерной последовательностью альфа-фактора дрожжей (SEQ ID NO: 7). Экспрессируемый таким образом белок направляют в среду для культивирования клеток, что тем самым позволяет определить связывание и экспрессию без дополнительной очистки полипептидов по настоящему изобретению. Все последовательности содержали С-концевую последовательность FLAG-foldon-HIS (SEQ ID NO: 4).

Связывание моноклональных антител (CR6261, CR9114, CR8020) с полипептидами по настоящему изобретению определяли посредством ELISA. Для этого планшеты для ELISA обрабатывали в течение ночи 2 мкг/мл раствора моноклонального антитела (20 мкл/лунка) при 4°C. После удаления раствора антитела оставшуюся поверхность блокировали 4% раствором порошкового обезжиренного сухого молока в PBS в течение не менее 1 ч. при комнатной температуре. После промывания планшетов 20 мкл среды для культивирования клеток (неразведенной или разведенной) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты для ELISA промывали и добавляли 20 мкл раствора антитела к FLAG-HRP (Sigma A8952, разведенного в 2000 раз в 4% обезжиренном сухом молоке в PBS-Tween). После инкубирования (1 ч при комнатной температуре) планшеты еще раз промывали и добавляли 20 мкл люминесцентного субстрата (Thermoscientific, № по кат. 34078) для обнаружения сигнала. В качестве альтернативы, для обнаружения сигнала можно применять способ колориметрического выявления.

Экспрессию полипептидов по настоящему изобретению определяли в анализе гомогенной флуоресценции с временным разрешением (в отношении общего описания см., например, Degorce et al., Curr. Chem. Genomics 2009 3: 22-32). Для этого смесь меченного тербием (Tb) моноклонального антитела к FLAG (донора) и меченного Alexa488 моноклонального антитела к His (акцептора) (раствор HTRF) получали путем добавления 210,5 мкл антитела к FLAG, меченного Tb (исходный раствор 26 мкг/мл), и 1,68 мл антитела к His, меченного 488 (исходный раствор 50 мкг/мл), к 80 мл смеси 1 к 1 культуральной среды и 50 mM HEPES+0,1% BSA. В каждую лунку планшета для ELISA добавляли 19 мкл раствора HTRF и добавляли 1 мкл культуральной среды. При возбуждении и после задержки, обеспечивающей затухание мешающих короткоживущих фоновых сигналов, протекающих от других соединений (белков, компонентов среды и т.д.), определяли показатель испускания флуоресценции при 520 и 665 нм. Это является мерой общего содержания белка в образце и применяется для нормализации сигналов связывания mAb между различными экспериментами.

Полипептиды, приведенные в табл. 3 и 4, экспрессировали в *P. pastoris*, следуя протоколам, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Собирали культуральную среду, и определяли связывание с CR6261 и экспрессию полипептидов стеблевого домена согласно описанному выше. Поскольку ответ в анализе связывания сопоставим с концентрацией экспрессируемого белка, сигнал связывания в ELISA нормализовали к экспрессии белка путем сравнения соотношения сигнала связывания и сигнала в анализе HTRF для каждой экспрессируемой последовательности. Все экспрессируемые белки характеризуются более высоким соотношением сигнала связывания с CR626 и сигнала HTRF по сравнению с исходной последовательностью SEQ ID NO: 6.

В дополнение, соотношение сигнала связывания с CR6261 и сигнала HTRF рассчитывали и сравнивали с соотношением, рассчитанным для исходной последовательности SEQ ID NO: 6. Результаты приведены в столбце 5 табл. 3 и 4; все экспрессируемые белки характеризуются более высокими соотношениями, что указывает на то, что стеблевые полипептиды, описанные выше, демонстрируют увеличенное связывание с CR6261.

Пример 2. Разработка и получение характеристик дополнительных полипептидов.

Полипептиды, описанные выше, содержат последовательность RMKQIEDKIEEIESKQ, полученную из белка-активатора транскрипции дрожжей GCN4, в CD-спирали. Данная последовательность обладает высокой склонностью к образованию спиральных вторичных структур и вследствие этого может повышать общую стабильность полипептида по настоящему изобретению. Неожиданно было обнаружено, что стабильность и агрегированное состояние стеблевых полипептидов гемагглютинаина зависят от точного местоположения и последовательности для полученной из GCN4 последовательности в первичной последовательности полипептидов.

В данном примере авторы настоящего изобретения описывают новый набор полипептидов, где последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20) введена в положения 419-433 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1; например SEQ ID NO: 81-110) или последовательность RMKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) введена в положения 417-433 (например, SEQ ID NO: 111-140).

Для этого полипептиды, описанные в примере 1, т.е. 74H9 (SEQ ID NO: 57), 127H1 (SEQ ID NO: 55), 71H2 (SEQ ID NO: 61), 86B4 (SEQ ID NO: 56), 115A1 (SEQ ID NO: 60), 2201C9 (SEQ ID NO: 63), 55G7 (SEQ ID NO: 59), 113E7 (SEQ ID NO: 64), 6E12 (SEQ ID NO: 58), 181H9 (SEQ ID NO: 62) были модифицированы с помощью методик молекулярной биологии, хорошо известных специалистам в данной области техники, для создания последовательностей 74H9-t2 (SEQ ID NO: 83), 127H1-t2 (SEQ ID NO: 81), 71H2-t2 (SEQ ID NO: 87), 86B4-t2 (SEQ ID NO: 82), 115A1-t2 (SEQ ID NO: 86), 220C9-t2 (SEQ ID NO: 89), 55G7-t2 (SEQ ID NO: 85), 113E7-t2 (SEQ ID NO: 90), 6E12-t2 (SEQ ID NO: 84), 181H9-t2 (SEQ ID NO: 88), содержащих последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20) в положениях 419-433.

Подобным образом создавали последовательности 74H9-t3 (SEQ ID NO: 113), 127H1-t3 (SEQ ID NO: 111), 71H2-t3 (SEQ ID NO: 117), 86B4-t3 (SEQ ID NO: 112), 115A1-t3 (SEQ ID NO: 116), 2201C9-t3 (SEQ ID NO: 119), 55G7-t3 (SEQ ID NO: 115), 113E7-t3 (SEQ ID NO: 120), 6E12-t3 (SEQ ID NO: 114), 181H9-t3 (SEQ ID NO: 118), содержащие последовательность RMKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) в положениях 417-433.

Полипептиды также можно создать на основе последовательности молекул HA различных штаммов вирусов. Под SEQ ID NO: 195-201, например, описаны полипептиды на основе последовательности HA штамма H1N1 A/California/07/09.

Как описано ранее, растворимые полипептиды можно создать путем удаления С-концевой части последовательностей на основе HA, например от остатка 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529 или 530 домена HA2 до С-конца домена HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1).

Полипептиды можно дополнительно стабилизировать путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), необязательно присоединяемой посредством линкера. Линкер может необязательно содержать участок расщепления для последующего процессинга согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Для облегчения очистки растворимой формы можно добавить последовательность метки, например His-метку (HHHHHHH (SEQ ID NO: 15) или HHHHHH (SEQ ID NO: 16)) или FLAG-метку (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 22) или их комбинацию, необязательно присоединяемую посредством коротких линкеров. Линкер может необязательно содержать участок (часть участка) протеолитического расщепления, например IEGR (SEQ ID NO: 24) (фактор X) или LVPRGS (SEQ ID NO: 23) (тромбин), для последующего процессинга согласно протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники.

Растворимые формы полипептидов SEQ ID NO: 55-64 и 81-90 создавали путем замещения эквивалентов остатков 519-565 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) последовательностью RSLVPRGSPGHHHHHHH, содержащей как модифицированный участок расщепления тромбином, так и 6-гистидиновую метку (SEQ ID NO: 21), и экспрессировали в клетках HEK293F, следуя протоколам, хорошо известным специалистам в данной области техники.

В целях сравнения растворимые формы H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2 (SEQ ID NO: 52) и H1-mini2-

cluster1+5+6-GCN4t3 (SEQ ID NO: 53), описанные в PCT/EP2012/073706, также включали в эксперименты. Собирали культуральную среду и выявляли связывание с CR6261, CR9114 посредством сэндвич-ELISA с применением покрывающего mAb CR6261 или CR9114 для захвата полипептида непосредственно из культуральной среды и антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP), направленного к С-концевой His-метке, для целей выявления. В качестве альтернативы, в сэндвич-ELISA для выявления захваченных с помощью CR9114 полипептидов применяли биотинилированное CR9114 в комбинации со стрептавидином, конъюгированным с HRP. Данный формат обеспечивает возможность выявления наличия мультимерных форм полипептидов. Все тестируемые полипептиды были способны к связыванию с CR9114 и CR6261, что определяли посредством ELISA. Повышенные уровни мультимеризации, выявляемые посредством захвата с помощью CR9114 в сэндвич-ELISA с применением биотинилированного CR9114 для выявления, наблюдались для s55G7-t2 (SEQ ID NO: 95), s86B4-t2 (SEQ ID NO: 92), s115A1-t2 (SEQ ID NO: 96), s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91), s113E7-t2 (SEQ ID NO: 100), s220C9-t2 (SEQ ID NO: 99), s71H2-t3 (SEQ ID NO: 127), s127H1-t3 (SEQ ID NO: 121), s74H9-t3 (SEQ ID NO: 123).

С целью получения препаратов полипептидов высокой степени чистоты для получения дополнительных характеристик клетки HEK293F трансфицировали вектором экспрессии pcDNA2004, содержащим гены, кодирующие растворимые формы 127H1-t2 (SEQ ID NO: 81), 86B4-t2 (SEQ ID NO: 82) и 55G7-t2 (SEQ ID NO: 85). Специалисту в данной области техники будет понятно, что лидерная последовательность (или сигнальная последовательность), которая определяет направление транспорта белка в ходе продуцирования (соответствующая аминокислотам 1-17 SEQ ID NO: 1), будет отсутствовать в секретируемом конечном полипептиде.

Для продуцирования полипептидов $1,0 \times 10^6$ живых клеток/мл высевали путем осаждения центрифугированием клеток HEK293F (Invitrogen) при 300 g в течение 5 мин и ресуспендирования в 300 мл подогретой среды Freestyle™ на колбу SF1000. Эту культуру инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 10% CO₂ при 110 об/мин в инкубаторе Multitron. Через 1 ч плазмидную ДНК отмеривали пипеткой в 9,9 мл среды Optimem до концентрации 1,0 мкг/мл в 300 мл объема культуры. Параллельно 440 мкл 293fectin® отмеривали пипеткой в 9,9 мл среды Optimem и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Через 5 мин смесь плазмидная ДНК/Optimem добавляли к смеси 293fectin®/Optimem и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин.

После инкубирования смесь плазмидная ДНК/293fectin® добавляли по каплям к клеточной суспензии. Трансфицированную культуру инкубировали при 37°C, 10% CO₂ и 110 об/мин в инкубаторе Multitron. В день 7 клетки отделяли от культуральной среды путем центрифугирования (30 мин при 3000 g), при этом надосадочную жидкость, содержащую растворимые полипептиды, фильтровали через верхний бутылочный фильтр на 0,2 мкм для дополнительной обработки.

Для целей очистки 1500 мл (s127H1_t2), 1800 мл (s86B4_t2) и 2400 мл (s55G7_t2) надосадочной жидкости культуры вносили в колонку с Ni-сефарозой HP на 24 мл, предварительно уравновешенную промывочным буфером (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7,8). После стадии промывания с 10 mM имидазола в промывочном буфере связанные полипептиды элюировали в ступенчатом градиенте 300 mM имидазола в промывочном буфере. Пики элюента собирали, концентрировали и вносили в колонку для эксклюзионной хроматографии для дополнительной очистки (Superdex 200). Фракции 55G7-t2 и 127H1-t2 собирали и объединяли, анализировали с помощью SDS-PAGE, ELISA и аналитической эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) для оценивания молекулярной массы. Результаты ELISA подтвердили связывание полипептидов с CR6261 и CR9114, но не с CR8020. Результаты SEC-MALS обобщены в табл. 9.

В табл. 8 указано, что полипептид s127H1-t2 характеризуется высоким выходом (~30 мг белка/л надосадочной жидкости культуры) по сравнению с 55G7-t2 и 86B4-t2. Большинство белков характеризуется молекулярным весом 62 кДа, что занимает промежуточное положение между ожидаемыми значениями для мономера или димера. Для подтверждения агрегированного состояния белка эксперимент по SEC-MALS повторяли в присутствии Fab-фрагментов, полученных из CR6261, CR9114 и CR8020. Результаты обобщены в табл. 8.

Результаты демонстрируют, что растворимая форма полипептида s127H1-t2 образует комплекс (о чем свидетельствует сдвиг пика на SEC-хроматограмме) в присутствии Fab-фрагментов CR6261 и CR9114, но не в случае CR8020. Это соответствует специфичности реакций связывания Fab-фрагментов, поскольку CR6261 и CR9114 связываются с НА, происходящими из группы 1, тогда как CR8020 этого не делает. Размер комплекса приведен в таблицах и указывает, что полипептид s127H1-t2 связывается с одним-двумя Fab-фрагментами, что указывает на то, что по меньшей мере часть популяции очищенного полипептида s127H1-t2 находится в димерной форме.

Для дополнительного анализа реакции связывания между полипептидом 127H1-t2 и mAb CR6261 и CR9114, а также для подтверждения наличия конформационных эпитопов CR6261 и CR9114 изучали образование этими антителами комплексов с очищенным белком с помощью биослойной интерферометрии (Octet Red³⁸⁴, Forte Bio). Для этого биотинилированные CR6261, CR9114 и CR8020 иммобилизовали на покрытых стрептавидином сенсорах, которые впоследствии подвергали воздействию сначала раствора

очищенного полипептида для измерения скорости ассоциации, а затем промывочного раствора для измерения скорости диссоциации.

Оба иммобилизованных CR6261 и CR9114 распознают полипептид, о чем свидетельствуют четкие ответы после воздействия растворимой формы 127H1-t2. В заключение, полипептид s127H1-t2 продуцируется в больших количествах и способен связываться с нейтрализующими моноклональными антителами широкого спектра действия CR6261 и CR9114 с высокой аффинностью, что подтверждает наличие соответствующих нейтрализующих эпитопов в этом полипептиде стеблевого домена. Полипептид обладает склонностью к образованию димерных структур.

Пример 3. Тримеры, стабилизированные дисульфидными связями, по настоящему изобретению.

Одним из способов улучшения представления нейтрализующих эпитопов на иммуногене в вакцине является конструирование дополнительных взаимодействий между мономерными иммуногенами с целью создания мультимерной молекулы с увеличенной стабильностью по сравнению с мономером. Недостаток данного способа заключается в том, что при объединении мономерных иммуногенов важные эпитопы могут потенциально закрываться следующим протомером. Поэтому во избежание этого следует проявлять осторожность. Полипептиды по настоящему изобретению, описанные в данном документе, получены из молекулы гемагглютинирина вируса гриппа. Данная молекула представляет собой тример в своем нативном состоянии на вирусной мембране. В данном документе авторы настоящего изобретения описывают модифицированные полипептиды по настоящему изобретению, которые образуют стабильные тримеры в растворе, оставляя при этом доступными эпитопы нейтрализующих mAb CR6261 и CR9114.

Для образования тримерного полипептида по настоящему изобретению разрабатывали стабилизирующие взаимодействия, способствующие тримеризации мономерных молекул стеблевых полипептидов на основе HA, сосредоточивая особое внимание на создании ковалентных дисульфидных мостиков между отдельными мономерами в тримере. Для этого трехмерные структуры FL HA H1N1 A/South Carolina/1/18 (PDB 1RD8) в своем нерасщепленном состоянии и H1N1 A/California/04/2009 (PDB: 3LZG) анализировали для идентификации зон, в которых близость другого мономера и особенности конформации белка потенциально могут обеспечивать возможность образования межмономерного дисульфидного мостика. Были идентифицированы одиннадцать пар остатков, для которых расстояние между остатками составляло менее 3,5 Å (табл. 9). Проявляли осторожность для обеспечения того, чтобы в каждой паре остатки располагались в разных протомерах (мономерных) в тримерной структуре. Эквиваленты этих остатков (определенные по выравниванию последовательностей) в полипептиде 127H1-t2 (SEQ ID NO: 160-170) и 55G7-t2 (SEQ ID NO: 149-159) подвергали мутации замены на цистеин с целью образования тримерных полипептидов, ковалентно соединенных посредством образования дисульфидных мостиков. С учетом симметрии 3 порядка тримерной молекулы HA успешные разработки приводят к образованию трех межпротомерных дисульфидных мостиков, ковалентно присоединяющих каждый из мономеров тримера к двум другим мономерам.

Для тестирования на наличие разработанных дисульфидных мостиков и нейтрализующих эпитопов CR9114 и CR6261 растворимые формы разработанных полипептидов экспрессировали в клетках HEK293F. Растворимые формы создавали посредством делеции эквивалентов остатков 530-565 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) в SEQ ID NO: 149-170 с созданием полипептидов SEQ ID NO: 171-192. Дополнительную последовательность EGRNNNNNNN (SEQ ID NO: 19) добавляли на С-конец, по существу вводя 7-гистидиновую метку для очистки, перед которой расположен участок протеолитического расщепления фактором X, для содействия очистке и/или выявлению.

Для продуцирования полипептидов $1,0 \times 10^6$ живых клеток/мл высевали путем осаждения центрифугированием клеток HEK293F (Invitrogen) при 300 g в течение 5 мин и ресуспендирования в 30 мл подогретой среды Freestyle™ на колбу SF250. Эту культуру инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 10% CO₂ при 110 об/мин в инкубаторе Multitron. Через 1 ч плазмидную ДНК отмеривали пипеткой в 1 мл среды Optimem до концентрации 1,0 мкг/мл в 30 мл объема культуры. Параллельно 44 мкл 293fectin® отмеривали пипеткой в 1 мл среды Optimem и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Через 5 мин смесь плазмидная ДНК/Optimem добавляли к смеси 293fectin®/Optimem и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. После инкубирования смесь плазмидная ДНК/293fectin® добавляли по каплям к клеточной суспензии. Трансфицированную культуру инкубировали при 37°C, 10% CO₂ и 110 об/мин в инкубаторе Multitron. В день 7 клетки отделяли от культуральной среды путем центрифугирования (30 мин при 3000 g), при этом надосадочную жидкость, содержащую растворимые полипептиды по настоящему изобретению, фильтровали через верхний бутылочный фильтр на 0,2 мкм для дополнительной обработки.

Культуральную среду собирали и анализировали в сэндвич-ELISA на наличие мультимерных форм полипептидов, представляющих два или более эпитопов нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114. Во-первых, для захвата экспрессируемых полипептидов непосредственно из культуральной среды применяли планшеты, покрытые CR9114. Во-вторых, для выявления захваченных с помощью CR9114 полипептидов по настоящему изобретению применяли биотинилированное CR9114 в

комбинации со стрептавидином, конъюгированным с HRP. В качестве контроля в анализ включали растворимый очищенный полноразмерный HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 в тримерной и мономерной формах (фиг. 2A). Результаты показаны на фиг. 2.

Тримерный полноразмерный HA демонстрирует четкий сигнал при слабом разведении, но в концентрации примерно 0,0001 мкг/мл и ниже этот сигнал больше не поддается выявлению (фиг. 2A). Для мономерного полноразмерного HA также наблюдается сигнал при слабом разведении, но его интенсивность намного ниже, и сигнал больше не поддается выявлению при приблизительно 0,02 мкг/мл и ниже. Наиболее вероятно, сигнал обусловлен некоторым остаточным тримером, который не смог отделиться от мономера в ходе очистки или образовался из мономера с течением времени. Растворимые формы H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4 (SEQ ID NO: 52) (фиг. 2A) и 127H1 (SEQ ID NO: 55) на фиг. 2B демонстрируют лишь сигналы низкой интенсивности, что указывает на низкие концентрации или отсутствие мультимерных полипептидов, экспонирующих эпитоп CR9114 в растворе. Растворимые формы 127H1-t2 (SEQ ID NO: 81) на фиг. 2B проявляют четкий ответ в данном анализе, что указывает на наличие некоторых мультимерных молекул, однако интенсивность наблюдаемых сигналов является низкой по сравнению с полноразмерным тримером HA.

Результаты для растворимых полипептидов на основе 55G7-t2 с дополнительными введенными цистеиновыми остатками показаны на фиг. 2C. Для большинства пептидов не наблюдались или наблюдались лишь очень слабые сигналы, что указывало на отсутствие в культуральной среде мультимерных молекул, представляющих эпитоп CR9114. Заметное исключение составляет полипептид s55G7-t2-cl18long (SEQ ID NO: 175; дополнительные цистеиновые остатки в положения 411 и 419; нумерация относится к SEQ ID NO: 1). Единственным другим полипептидом, который демонстрирует выявляемый ответ, является s55G7-t2-cl14long (SEQ ID NO: 171; дополнительные цистеиновые остатки в положения 423 и 424), однако сигналы являются более слабыми и исчезают при более слабом разведении.

Результаты для полипептидов на основе 127H1-t2 показаны на фиг. 2D. В этом случае наблюдается четкий ответ для полипептидов s127H1-t2-cl14long (SEQ ID NO: 182; дополнительные цистеиновые остатки в положениях 423 и 424), s127H1-t2-cl15long (SEQ ID NO: 183; дополнительные цистеиновые остатки в 430 и 431), s127H1-t2-cl17long (SEQ ID NO: 185; дополнительные цистеиновые остатки в 405 и 429) и s127H1-t2-cl24long (SEQ ID NO: 191; дополнительные цистеиновые остатки в 344 и 467) и в меньшей степени для s127H1-t2-cl19long (SEQ ID NO: 187; дополнительные цистеиновые остатки в 38 и 390) и s127H1-t2-cl23long (SEQ ID NO: 190; дополнительные цистеиновые остатки в 342 и 460). Слабый, но выявляемый ответ наблюдается для s127H1-t2-cl16long (SEQ ID NO: 184; дополнительные цистеиновые остатки в 404 и 433). Однако, как и в случае с 55G7-t2, лучший результат получают для варианта s127H1-t2-cl18long с дополнительными цистеиновыми остатками, введенными в положения 411 и 419 (SEQ ID NO: 186).

Для получения дополнительных характеристик полипептидов по настоящему изобретению с дополнительными цистеиновыми остатками надосадочную жидкость культуры анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением протоколов, общепринятых в данной области техники. Для целей выявления применяли поликлональное антитело, направленное к белку HA H1N1 (A/California/04/2009). Для тримера в невосстанавливающих условиях, т.е. в случае, когда дисульфидные мостики находятся в неизменном состоянии, ожидается полоса белка при ~90 кДа или более (в зависимости от степени гликозилирования), тогда как в восстанавливающих условиях ожидается полоса, близкая к 35 кДа (соответствующая гликозилированному мономерному полипептиду по настоящему изобретению). Результаты показаны на фиг. 3A и 3B. В случае вариантов 55G7-t2, содержащих дополнительные цистеиновые остатки, в восстанавливающих условиях наблюдались сильные сигналы для s55G7-t2-cl18long и s55G7-t2-cl22long и в меньшей степени для s55G7-cl14long. В невосстанавливающих условиях для s55G7-t2-cl18long и s55G7-t2-cl22long наблюдалось пятно белков различных размеров, превышающих 100 кДа, что указывало на наличие в этих образцах полипептидов стеблевого домена, соединенных ковалентными поперечными связями. Пятно также наблюдают для s55G7-cl14long, однако интенсивность является меньшей, чем наблюдаемая для s55G7-cl18 и s55G7-cl22.

Результаты вестерн-блоттинга полипептидов, содержащих дополнительные цистеиновые остатки, полученных из 127H1-t2, в восстанавливающих условиях (фиг. 3C) указывают на сильные сигналы для s127H1-t2-cl14long, s127H1-t2-cl15long, s127H1-t2-cl16long, s127H1-t2-cl17long и s127H1-t2-cl18long. Для s127H1-t2-cl17long и s127H1-t2-cl18long в невосстанавливающих условиях наблюдается выраженная полоса белка, близкая к 100 кДа (фиг. 3D), что указывает на наличие полипептидов стеблевого домена, соединенных ковалентными поперечными связями. Полипептиды s127H1-t2-cl14long и s127H1-t2-cl15long также демонстрируют некоторую интенсивность вблизи 100 кДа в вестерн-блоттинге, однако сигнал не является настолько сильным, как для s127H1-t2-cl17long и в особенности для s127H1-t2-cl18long. Дисульфидный мостик (cl18) в данной конструкции соединяет В-петлю одного мономера с верхней частью CD-спирали другого мономера, как указано на фиг. 4, и дает наиболее существенные результаты в окружении как 55G7-t2, так и 127H1-t2.

Lu и соавт. (PNAS 2013) описывают полипептид стеблевого домена HA, который содержит не-

сколько межмономерных дисульфидных мостиков. Их конструкция продуцируется в бесклеточной системе на основе *E.coli* и, в отличие от белков, описанных в данном документе, представляет собой несвернутый белок, который необходимо подвергнуть рефолдингу. Стеблевой полипептид у Lu и соавт. содержит тримеризационный домен фолдон на С-конце, и мономеры соединены ковалентно посредством нескольких дисульфидных связей. Описанные дисульфидные связи расположены в тримеризационном домене фолдоне или в происходящей из НА части стеблевого полипептида НА. В происходящей из НА части полипептида описаны четыре потенциальные дисульфидные связи, включающие в себя цистеиновые остатки в положениях 423 и 424 (кластер 14) и 430 и 431 (кластер 15). В описанном полипептиде стеблевого домена лучшие результаты были получены для цистеиновых остатков в положениях 430 и 431 (кластер 15), хотя тримеризацию также можно было наблюдать для цистеиновых остатков в положениях 423 и 424 (кластер 14). В обоих случаях в С-концевом домене фолдоне присутствовал дополнительный дисульфидный мостик. Результаты в данном документе неожиданно демонстрируют, что в отсутствие С-концевого тримеризационного домена с дисульфидными связями сконструированный дисульфидный мостик, ковалентно соединяющий два различных мономера посредством цистеиновых остатков в положениях 411 и 419, обуславливает получение более высоких количеств тримерного полипептида стеблевого домена. В заключение, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что введение стратегически размещаемых пар остатков, соединенных дисульфидными связями, может приводить к мультимеризации стеблевых полипептидов НА. В частности, одновременное введение цистеиновых остатков в положения 411 и 419 (кластер 18) приводит к образованию мультимерных молекул в растворе, о чем свидетельствуют результаты вестерн-блоттинга и сэндвич-ELISA.

Пример 4. Очистка и получение характеристик тримерного полипептида по настоящему изобретению.

Для получения дополнительных характеристик полипептида 127H1-t2-cl18 по настоящему изобретению очищали белок. Для облегчения очистки трансмембранный и цитозольный домены на С-конце белка можно удалить согласно описанному выше с созданием растворимого варианта белка. Специалисту в данной области техники будет понятно, что лидерная последовательность (или сигнальная последовательность), которая определяет направление транспорта белка в ходе продуцирования (соответствующая аминокислотам 1-17 SEQ ID NO: 1), будет отсутствовать в секретируемом конечном полипептиде. Неограничивающим примером растворимых полипептидов по настоящему изобретению является s127H-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186).

С целью получения препарата полипептида по настоящему изобретению высокой степени чистоты клетки HEK293F трансфицировали вектором экспрессии pcDNA2004, содержащим ген, кодирующий полипептид s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186), содержащий дополнительную С-концевую последовательность His-метки (EGRHHHHHHH), и культивировали в течение 7 дней, следуя протоколам, общепринятым в данной области техники. Для целей очистки 300 мл надосадочной жидкости культуры вносили в колонку HisTrap на 5 мл, предварительно уравновешенную промывочным буфером (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7,8). После стадии промывки с 10 mM имидазола в промывочном буфере связанный полипептид по настоящему изобретению элюировали в ступенчатом градиенте 300 mM имидазола в промывочном буфере. Пики элюента собирали, подвергали замене буфера, концентрировали и вносили в колонку для эксклюзионной хроматографии для дополнительной очистки (Superdex 200). Профиль элюирования показан на фиг. 5A, фракции 1-4 собирали, как указано на чертеже, и анализировали с помощью SDS-PAGE (фиг. 5B), нативного PAGE (фиг. 5C) и вестерн-блоттинга (фиг. 5D).

В невозстанавливающих условиях в SDS-PAGE показана четкая полоса для фракций 2 и 3 между 100 и 150 кДа согласно ожидаемому для тримерного полипептида с ковалентными связями по настоящему изобретению, тогда как для фракции 4 показана диффузная полоса, концентрирующаяся вблизи 37 кДа, что близко к размеру, ожидаемому для мономерного полипептида по настоящему изобретению. Изменчивость размера обусловлена изменчивостью степени гликозилирования полипептида и наблюдалась для других полипептидов стеблевого домена, полученных из НА. При восстановлении дисульфидных мостиков основная полоса во фракции 3 сдвигается к приблизительно 37 кДа, весьма сходно с полосой, наблюдаемой для фракции 4, что указывает на то, что восстановление приводит к мономеризации. Для фракции 2 невозможно четко различить сдвиг. Во фракции 1 показаны белки в диапазоне размеров без четкой основной полосы.

Путем нативного PAGE (невозстанавливающих условиях) показано четкое различие в размере между белками во фракциях 3 и 4, при этом основные полосы расположены соответственно между 146 и 240 кДа и ниже 66 кДа. Для фракции 2 наблюдается слабый сигнал между 146 и 240 кДа, тогда как во фракции 1 белок выявить невозможно, вероятно, по причине образования крупных агрегатов.

Данные вестерн-блоттинга (невозстанавливающие условия) с применением поликлонального антитела к His для выявления подтверждают, что основная полоса во фракции 3 соответствует материалу с гистидиновой меткой, поскольку между 100 и 150 кДа наблюдается четкая полоса. Для фракции 2 наблюдается слабый сигнал вблизи ожидаемого размера тримера, но также выявляются олигомеры более высокого порядка, тогда как для фракции 4 наблюдается слабый и диффузный сигнал вблизи 37 кДа. Эти

данные подтверждают, что основные полосы во фракциях 2, 3 и 4 происходят от HA Н1. Для белка во фракции 1 сигнал не наблюдался.

Наличие нейтрализующих эпитопов CR6261, CR9114 и CR8020 определяли посредством ELISA, применяя покрывающее моноклональное антитело к His-метке для захвата полипептида с His-меткой по настоящему изобретению. После связывания изучаемого mAb для выявления применяли вторичное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена. В качестве контролей включали мономерный и тримерный полноразмерный HA Н1 (антиген), а также поликлональную сыворотку крови, направленную к HA Н1 (для выявления). Результаты показаны на фиг. 6. Связывание с mAb CR6261 и CR9114 четко наблюдается для фракций 2, 3 и 4, а также для мономерного и тримерного FL HA. Для фракции 1 наблюдался лишь слабый сигнал связывания с CR9114 и практически отсутствовал сигнал связывания с CR6261. Ни в одной из фракций не наблюдается связывание с CR8020 (mAb, специфичным для HA из группы 2). Мономерный FL HA распознается поликлональным антителом к HA Н1, но ответ на тримерный FL HA является намного более слабым, возможно, по причине сокрытия некоторых эпитопов в тримере по сравнению с мономером. Сходная картина наблюдается среди результатов во фракции 3 (тримеры в SDS-PAGE) и фракции 4 (мономеры в SDS-PAGE), что согласуется с наличием во фракции 3 правильно свернутой тримерной формы полипептида по настоящему изобретению в растворе.

Фракции 1-4 также тестировали в сэндвич-ELISA с применением CR9114 для выявления мультимерных полипептидов по настоящему изобретению, описанных выше (см. фиг. 7). В целях сравнения в эксперимент вновь включали мономерный и тримерный FL HA. Фракция 3 проявляет ответ, весьма сходный с тримерным FL HA, что согласуется с наличием тримерной формы полипептида по настоящему изобретению, тогда как ответ для фракций 2 и 4 занимает промежуточное положение между мономерным и тримерным FL HA.

Образование комплекса между Fab-фрагментами CR6261, CR9114 и CR8020 и s127H1-t2-cl18long изучали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) для оценивания молекулярной массы белка во фракции 3 (фиг. 8). Результаты демонстрируют, что полипептид, присутствующий во фракции 3, имеет молекулярный вес приблизительно 110 кДа, что соответствует образованию тримера (расчетный молекулярный вес мономера на основании аминокислотной последовательности без учета гликозилирования составляет 29,2 кДа). Полипептид s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению образует комплекс (о чем свидетельствует сдвиг пика на SEC-хроматограмме) в присутствии Fab-фрагментов CR6261 и CR9114, но не в случае CR8020. Это согласуется со специфичностью реакций связывания Fab-фрагментов, поскольку CR6261 и CR9114 связываются с HA, происходящими из группы 1, тогда как CR8020 этого не делает. Размер образующегося комплекса составляет приблизительно 215 и 248 кДа для Fab-фрагментов CR6261 и CR9114 соответственно и указывает на то, что полипептид 127H1-t2-cl18 может связываться с 3 Fab-фрагментами (ожидаемый молекулярный вес для тримера в комплексе с 3 Fab-фрагментами составляет приблизительно 250 кДа; молекулярные массы, полученные в экспериментах по SEC-MALS, обобщены в табл. 10).

Пример 5. Получение характеристик полипептидов по настоящему изобретению.

Для дополнительного анализа реакции связывания между полипептидом 127H1-t2-cl18 по настоящему изобретению и mAb CR6261 и CR9114, а также для повторного подтверждения наличия конформационных эпитопов CR6261 и CR9114 изучали образование этими антителами комплексов с очищенным белком с помощью биослойной интерферометрии (Octet Red³⁸⁴, Forte Bio). Для этого биотинилированные CR6261, CR9114 и CR8020 иммобилизовали на покрытых стрептавидином сенсорах, которые впоследствии подвергали воздействию сначала раствора очищенного полипептида 127H1-t2-cl18 по настоящему изобретению для измерения скорости ассоциации, а затем промывочного раствора для измерения скорости диссоциации. Результаты показаны на фиг. 9.

Оба иммобилизованных CR6261 и CR9114 распознают полипептид по настоящему изобретению, о чем свидетельствуют четкие ответы после воздействия растворимой формы 127H1-t2-cl18 (фиг. 9A и B). Чтобы оценить константу диссоциации для связывающего взаимодействия, проводили титрование с применением серий 2-кратных разведений. Сенсоры, содержащие иммобилизованное CR6261 или CR9114, подвергали воздействию растворов растворимого s127H1-t2-cl18long в концентрациях 10, 5, 2,5, 1,3 и 0,63, 0,31 и 0,16 нМ соответственно, и регистрировали конечный ответ через 6600 с. Ответы откладывали на графике в зависимости от концентрации полипептида стеблевого домена, и проводили аппроксимацию к модели связывания в стационарном состоянии, получая константу диссоциации K_d 0,7 нМ для комплекса CR6261/полипептид стеблевого домена и 0,5 нМ для комплекса с CR9114 (фиг. 9C и D).

В заключение, полипептид 127H1-t2-cl18 по настоящему изобретению образует тример при помощи ковалентных связей, способный связываться с нейтрализующими моноклональными антителами широкого спектра действия CR6261 и CR9114 с высокой авидностью, что подтверждает наличие соответствующих нейтрализующих эпитопов в этом полипептиде стеблевого домена. Стехиометрическое соотношение реакции связывания в растворе составляет 1:3, что указывает на то, что нейтрализующие эпитопы присутствуют в каждом отдельном мономере тримера.

Пример 6. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению в

модели летального контрольного заражения гриппом.

С целью дополнительной оценки профилактической эффективности полипептида s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) в модели летального контрольного заражения гриппом группы из 8-14 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 1, 2 и 3 раза с интервалами в 3 недели 30 мкг очищенного s127H1-t2-cl18long с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения i.v. вводили нейтрализующее антитело широкого спектра действия, моноклональное антитело CR6261 (15 мг/кг), за 1 день до контрольного заражения, тогда как иммунизация с PBS служила в качестве отрицательного контроля. Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 25×LD50 гетерологичного вируса для контрольного заражения (H1N1 A/Puerto Rico/8/34) и ежедневно отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель. Сыворотку крови до контрольного заражения (полученную через 4 недели после заключительной иммунизации) тестировали в анализах ELISA на связывание с полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению, который применяли для иммунизации (для проверки правильности иммунизации), на связывание с растворимым полноразмерным НА H1N1 A/Brisbane/59/07 (для проверки распознавания полноразмерного НА) и на конкуренцию с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, моноклональным антителом CR9114, за связывание с полноразмерным НА (для определения того, связываются ли индуцированные антитела в непосредственной близости с эпитопом нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114). Результаты показаны на фиг. 10-15.

Результаты демонстрируют, что эксперимент является достоверным, поскольку все мыши в контрольной группе с PBS погибают от инфекции в день 7 после контрольного заражения, тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена (фиг. 10A). Девять из 10 мышей, однократно иммунизированных S127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186), выживали после летального контрольного заражения, и все мыши выживали после двух или трех иммунизаций (фиг. 11). В дополнение, потеря веса тела была весьма незначительной для животных, которые были иммунизированы два или три раза (фиг. 12), и не наблюдались (2 или 3 раза) или наблюдались минимальные (1 раз) клинические признаки (фиг. 13). По сравнению с контрольной группой с PBS для всех групп, иммунизированных полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению, наблюдалось статистически значимое увеличение доли выживших, увеличение продолжительности выживания, уменьшение потери веса тела и снижение клинических показателей.

Данные ELISA в моменты времени до контрольного заражения через 4 недели после заключительной иммунизации с применением s127H1-t2-cl18long (фиг. 14A) или растворимого полноразмерного НА (фиг. 14B) в качестве антигена указывают на то, что полипептид s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению является иммуногенным и индуцирует выработку антител, которые способны к распознаванию полноразмерного НА даже после одной иммунизации, хотя уровни являются существенно более высокими после двух и трех иммунизаций.

Для более глубокого понимания иммунологического ответа на иммунизацию проводили ELISA с конкурентным связыванием. Для этого полноразмерный НА, связанный на планшете, инкубировали с образцами сыворотки крови в серийном разведении, после чего добавляли CR9114-биотин в заранее определенной подобранной концентрации. После дополнительного инкубирования оценивали количество связанного CR9114-биотина с применением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, следуя протоколам, хорошо известным из уровня техники. Данные анализировали с применением устойчивой линейной регрессии зависимости OD от log разведения, выраженной в виде 'наклона OD' ($\Delta OD/10$ -кратное разведение). Данные демонстрируют, что уровни антител, которые способны конкурировать с нейтрализующим антителом широкого спектра действия CR9114 за связывание, индуцируются путем иммунизации полипептидами по настоящему изобретению с добавленными вспомогательными средствами. После двух иммунизаций данные уровни отчетливо превышают фоновые значения, и они продолжают возрастать после третьей иммунизации (фиг. 15, вверху). В качестве сравнения на отдельном графике показаны уровни, индуцированные моноклональными антителами немеченым CR9114 (т.е. при самоконкуренции) и несвязывающим CR8020, оба из которых находятся в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл (фиг. 15, внизу).

В заключение, авторы настоящего изобретения показали, что иммунизация полипептидом s127H1-t218long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) может защищать мышей от летальной гриппозной инфекции даже после одного цикла иммунизации. Полипептид является иммуногенным и индуцирует выработку антител, которые могут связываться с полноразмерным НА. По меньшей мере часть индуцированных антител связываются с эпитопом, который представляет собой эпитоп нейтрализующего моноклонального антитела широкого спектра действия CR9114, или рядом с ним.

Пример 7. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению в модели летального контрольного заражения гетеросубтипическим вирусом гриппа H5N1.

С целью дополнительной оценки профилактической эффективности полипептида s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) в модели летального контрольного заражения

вирусом гриппа H5N1 группы из 8-12 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалами в 3 недели 30 мкг очищенного s127H1-t2-cl18long с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения i.v. вводили нейтрализующее антитело широкого спектра действия, моноклональное антитело CR6261 (15 мг/кг), за 1 день до контрольного заражения, тогда как иммунизация с PBS служила в качестве отрицательного контроля. Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 12,5×LD50 гетеросубтипического вируса для контрольного заражения (H5N1 A/Hong Kong/156/97) и ежедневно отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель. Результаты показаны на фиг. 16.

Результаты демонстрируют, что эксперимент является достоверным, поскольку все мыши в контрольной группе с PBS погибают от инфекции в дни 8-10 после контрольного заражения, тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена (фиг. 16A). Десять из 10 мышей, иммунизированных s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186), выживают после летального контрольного заражения (фиг. 16B). В дополнение, потеря веса тела для этих животных была весьма незначительной (фиг. 16C), и в течение периода последующего наблюдения не наблюдались клинические симптомы (фиг. 16D). По сравнению с контрольной группой с PBS для группы, иммунизированной полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению, наблюдается статистически значимое увеличение доли выживших, увеличение продолжительности выживания, уменьшение потери веса тела и снижение клинических показателей.

В заключение, авторы настоящего изобретения показали, что иммунизация полипептидом s127H1-t2118long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) может защищать мышей от летального инфицирования гетеросубтипическим штаммом H5N1 вируса гриппа.

Пример 8. Оценка широты спектра связывания для сывороточных антител, выработка которых вызывается посредством иммунизации полипептидом по настоящему изобретению.

Результаты, описанные в примере 6, указывают на то, что полипептид s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) является иммуногенным и может вызывать выработку антител, которые способны распознавать FL HA штамма, применяемого в качестве основы для разработки полипептидов по настоящему изобретению. Образцы сыворотки мышей, иммунизированных 3 раза согласно описанному в примере 7, также тестировали на связывание с полноразмерными HA ряда других штаммов вируса гриппа из группы I (H1, H5 и H9) и группы II (H3 и H7) посредством ELISA, следуя протоколам, хорошо известным из уровня техники (фиг. 17). Результаты демонстрируют, что антитела, индуцированные полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186), эффективно распознают эпитопы, присутствующие в нативных последовательностях FL HA, и что эпитопы, с которыми связываются антитела, являются консервативными среди различных штаммов вируса гриппа из группы I (в частности, H1, H5 и H9) и даже некоторых из группы II (например, H7).

Пример 9. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению в модели летального контрольного заражения вирусом гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007.

С целью дополнительной оценки профилактической эффективности полипептида s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) в модели летального контрольного заражения вирусом гриппа H1N1 группы из 8-18 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалами в 3 недели 30 мкг очищенного s127H1-t2-cl18long с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения i.v. вводили нейтрализующее антитело широкого спектра действия, моноклональное антитело CR6261 (15 мг/кг), за 1 день до контрольного заражения, тогда как иммунизация с PBS служила в качестве отрицательного контроля. Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 12,5×LD50 вируса для контрольного заражения (H1N1 A/Brisbane/59/2007) и ежедневно отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель.

Результаты демонстрируют, что эксперимент является достоверным, поскольку все мыши в контрольной группе с PBS погибают от инфекции в дни 7-10 после контрольного заражения, тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена (фиг. 18A). Десять из 10 мышей, иммунизированных s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186), выживают после летального контрольного заражения (фиг. 18B). В дополнение, потеря веса тела через 4 дня после инфицирования составляет в среднем приблизительно 10% (фиг. 18C), однако в течение 10 дней животные полностью восстанавливаются. Клинические симптомы также достигают пика через 4 дня после инфицирования, однако отсутствуют, начиная с дня 9 после инфицирования (фиг. 18D). По сравнению с контрольной группой с PBS для группы, иммунизированной полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению, наблюдается статистически значимое увеличение доли выживших, увеличение продолжительности выживания, уменьшение потери веса тела и снижение клинических показателей.

В заключение, авторы настоящего изобретения показали, что иммунизация полипептидом s127H1-t2118long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) может защищать мышей от летального инфицирования H1N1 A/Brisbane/59/2007.

Пример 10. Оценка наличия нейтрализующих антител к вирусу гриппа в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению.

Для дополнительного исследования антителоопосредованных эффекторных механизмов, играющих роль в защите от гриппа, образцы сыворотки крови до контрольного заражения тестировали в анализе нейтрализации псевдочастиц (Alberini и соавт., 2009) с применением псевдочастиц, полученных из H5N1 A/Vietnam/1194/04, как описано ниже.

Анализ нейтрализации псевдочастиц.

Псевдочастицы, экспрессирующие FL HA, получали согласно описанному ранее (Temperton и соавт., 2007). Нейтрализующие антитела определяли с применением одного цикла трансдукции клеток HEK293 псевдочастицами H5 A/Vietnam/1194/04, кодирующими репортерный ген люциферазы, согласно описанному ранее (Alberini и соавт., 2009) с некоторыми модификациями. Вкратце, термоинактивированные (30 мин при 56°C) образцы сыворотки крови до контрольного заражения серийно разводили с 3-кратным шагом в среде для выращивания (среде MEM Игла с EBSS (Lonza, Базель, Швейцария), дополненной 2 mM L-глутамин (Lonza), 1% раствором заменимых аминокислот (Lonza), 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина (Lonza) и 10% FBS (Euroclone, Перо, Италия) в трех повторностях в 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах, и добавляли подобранное количество псевдочастиц H5 A/Vietnam/1194/04 (с получением 10^6 относительных единиц люминесценции (RLU) после инфицирования). Спустя 1 ч инкубирования при 37°C и 5% CO₂ добавляли 10^4 клеток HEK293 на лунку. Спустя 48 ч инкубирования при 37°C и 5% CO₂ добавляли субстрат для люциферазы (Britelite Plus, Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс) и с помощью люциметра (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Германия) измеряли люминесценцию согласно инструкциям производителя.

Образцы сыворотки крови до контрольного заражения, полученные от животных, иммунизированных полипептидом s127H1-t2118long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) согласно описанному в примерах 6-8, демонстрировали выявляемую нейтрализацию при высоких сывороточных концентрациях при применении анализа нейтрализации псевдочастиц (фиг. 19). Это демонстрирует способность полипептида по настоящему изобретению при применении в качестве иммуногена вызывать выработку нейтрализующих антител широкого спектра действия. Помимо непосредственной нейтрализации вируса, Fc-опосредованные эффекторные механизмы, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), существенно способствуют защите от гриппа, при этом bnAb, направленные на стеблевой домен, являются особенно эффективными в этих механизмах (DiLillo и соавт., 2014). С целью тестирования того, были ли антитела, выработка которых вызывается после иммунизации полипептидом s127H1-t2118long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186), способными индуцировать ADCC, авторы настоящего изобретения тестировали образцы сыворотки крови с применением анализа ADCC в модели (Parekh и соавт., 2012; A. Schnueriger и соавт., 2012; Cheng и соавт., 2014), адаптированного для мышей, как описано ниже.

Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в модели.

Эпителиальные клетки A549, полученные из карциномы легкого человека (ATCC CCL-185), выращивали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM), дополненной 10% термоинактивированной фетальной телячьей сывороткой крови, при 37°C, 10% CO₂. За два дня до эксперимента клетки A549 трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей HA H5 A/Hong Kong/156/97 или HA H1 A/Brisbane/59/2007, с помощью Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в Opti-MEM (Invitrogen). За день до анализа трансфицированные клетки собирали и высевали в белые 96-луночные планшеты (Costar) для анализа ADCC и в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном (BD Falcon) для визуализации. Через 24 ч образцы разводили в аналитическом буфере (4% FBS (Gibco) со сверхнизким содержанием IgG в RPMI 1640 (Gibco)) и подвергали термоинактивации в течение 30 мин при 56°C с последующим серийным разведением в аналитическом буфере. Для биологического анализа ADCC клетки A549 дополняли свежим аналитическим буфером и к клеткам добавляли разведения антител и эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие Fc-гамма-рецептор IV мыши (FcγRIV; Promega), для биологического анализа ADCC и инкубировали в течение 6 ч при 37°C в соотношении мишень/эффектор 1:4,5. Клетки уравнивали до комнатной температуры в течение 15 мин перед добавлением субстрата Bio-Glo для люциферазной системы (Promega). Через 10 мин на Synergy Neo (Biotek) считывали люминесценцию. Данные выражены в виде кратности индукции сигнала в отсутствие сыворотки крови.

Путем применения данного анализа образцы сыворотки крови до контрольного заражения, полученные от животных, иммунизированных полипептидом s127H1-t2118long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) согласно описанному в примерах 6-8, тестировали на активность передачи сигналов через FcγRIV с применением клеток-мишеней, трансфицированных FL HA H5N1 A/Hong Kong/156/97 или H1N1 A/Brisbane/59/07 в качестве источника антигена (фиг. 20). В обоих случаях наблюдается 30-40-кратная индукция при наиболее высокой тестируемой сывороточной концентрации, что демонстрирует способность полипептида по настоящему изобретению вызывать выработку антител, которые активируют передачу сигналов через FcγRIV, указывая на эффекторную функцию ADCC/ADCP у мышей.

Эти результаты, показанные в примерах 6-9, демонстрируют способность полипептида s127H1-

t2118long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186) вызывать выработку нацеленных на стеблевой домен, нейтрализующих и опосредующих ADCC антител и защищать мышей от летального контрольного заражения гомологичными, гетерологичными и гетеросубтипическими штаммами вируса гриппа из группы I.

Пример 11. Разработка полипептида по настоящему изобретению на основе HA H1N1 A/California/07/09.

В примерах 1-10 описаны полипептиды по настоящему изобретению на основе HA H1N1 A/Brisbane/59/2007. Сходные полипептиды также можно разработать на основе другого HA других штаммов вируса гриппа, таких как H1N1 A/California/07/09. Таким образом, следуя процедурам, изложенным в общих чертах выше, создавали полипептиды по настоящему изобретению, описанные под SEQ ID NO: 202 и 203.

Пример 12. Разработка дополнительных полипептидов по настоящему изобретению на основе HA штаммов H1.

В примерах 1-11 описаны полипептиды по настоящему изобретению на основе HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1) и H1N1 A/California/07/09 (SEQ ID NO: 252). Сходные полипептиды также можно разработать на основе HA других штаммов вируса гриппа H1, и они также включены в настоящее изобретение. Неограничивающими примерами являются HA H1N1 A/Texas/UR06-0526/07 (SEQ ID NO: 205), H1N1 A/New York/629/95 (SEQ ID NO: 206) и H1N1 A/AA_Marton/43 (SEQ ID NO: 204). Таким образом, следуя процедурам, изложенным в общих чертах выше, создавали полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению, содержащие сконструированные дисульфидные мостики между цистеиновыми остатками в положениях 411 и 419 (кластер 18), описанные под SEQ ID NO: 207-216. SEQ ID NO: 202, 203, 213 и 214 содержат дополнительную мутацию замены на лизин, введенную в положение 415 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1), для создания последовательности В-петли согласно SEQ ID NO: 8; эти последовательности также включены в настоящее изобретение.

Пример 13. Экспрессия и получение характеристик полипептидов по настоящему изобретению.

Для тестирования на наличие разработанных дисульфидных мостиков и нейтрализующих эпитопов CR9114 и CR6261 растворимые формы разработанных полипептидов экспрессировали в клетках HEK293F. Растворимые формы создавали посредством делеции эквивалентов аминокислотных остатков 530-565 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1) в SEQ ID NO: 202, 207, 209, 213 для создания полипептидов SEQ ID NO: 203, 208, 210 и 214 по настоящему изобретению соответственно. Следует отметить, что этими последовательностями описана процессированная форма полипептидов, т.е. после удаления лидерной последовательности. Дополнительную последовательность EGRNNNNNNN (SEQ ID NO: 19) или, в случае SEQ ID NO: 208, EGRNNNNNNN добавляли к С-концу, по существу вводя 7- или 6-гистидиновую метку для очистки, перед которой расположен участок протеолитического расщепления фактором X, для содействия очистке и/или выявлению.

Для продуцирования полипептидов $1,0 \times 10^6$ живых клеток/мл высевали путем осаждения центрифугированием клеток HEK293F (Invitrogen) при 300 g в течение 5 мин и ресуспендирования в 30 мл подогретой среды Freestyle™ на колбу SF250. Эту культуру инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 10% CO₂ при 110 об/мин в инкубаторе Multitron. Через 1 ч плазмидную ДНК отмеривали пипеткой в 1 мл среды Optimem до концентрации 1,0 мкг/мл в 30 мл объема культуры. Параллельно 44 мкл 293fectin® отмеривали пипеткой в 1 мл среды Optimem и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Через 5 мин смесь плазмидная ДНК/Optimem добавляли к смеси 293fectin®/Optimem и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. После инкубирования смесь плазмидная ДНК/293fectin® добавляли по каплям к клеточной суспензии. Трансфицированную культуру инкубировали при 37°C, 10% CO₂ и 110 об/мин в инкубаторе Multitron. В день 7 клетки отделяли от культуральной среды путем центрифугирования (30 мин при 3000 g), при этом надосадочную жидкость, содержащую растворимые полипептиды по настоящему изобретению, фильтровали через верхний бутылочный фильтр на 0,2 мкм для дополнительной обработки.

Культуральную среду собирали и анализировали в сэндвич-ELISA на наличие мультимерных форм полипептидов, представляющих два или более эпитопов нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114. Во-первых, для захвата экспрессируемых полипептидов непосредственно из культуральной среды применяли планшеты, покрытые CR9114. Во-вторых, для выявления захваченных с помощью CR9114 полипептидов по настоящему изобретению применяли биотинилированное CR9114 в комбинации со стрептавидином, конъюгированным с HRP. В целях сравнения растворимый очищенный полноразмерный HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 в тримерной и мономерной формах, а также очищенный тримерный s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186) включали в анализ (исходная концентрация 5 мкг/мл). Результаты показаны на фиг. 21A.

Тримерный полноразмерный HA демонстрирует четкий сигнал при слабом разведении, но при разведении 1 к 6561 или более (т.е. при более низкой концентрации) этот сигнал больше не поддается выявлению (фиг. 21A). Для мономерного полноразмерного HA также наблюдается сигнал при слабом разведении, но его интенсивность намного ниже, и сигнал больше не поддается выявлению при разведении 1 к

729. Наиболее вероятно, сигнал обусловлен некоторым остаточным тримером, который не смог отделиться от мономера в ходе очистки или образовался из мономера с течением времени. Очищенный тримерный s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186), содержащий дополнительную С-концевую последовательность His-метки (EGRHHHHHHH) (исходная концентрация 5 мкг/мл), также обуславливает четкий сигнал в данном анализе, который становится невыявляемым при концентрации 1 к 19683. Культуральная среда, содержащая полипептиды SEQ ID NO: 203, 208, 210 и 214 по настоящему изобретению, также демонстрирует четкие сигналы в данном анализе, что указывает на наличие мультимерных полипептидов по настоящему изобретению. Наиболее сильные ответы наблюдаются для полипептида, полученного из A/California/07/09 (SEQ ID NO: 203). Более слабый ответ в данном анализе, наблюдаемый для полипептида по настоящему изобретению, полученного из H1N1 A/AA_Marton/1943 (SEQ ID NO: 214), обусловлен более низкой экспрессией данного конкретного полипептида по настоящему изобретению, о чем свидетельствуют результаты вестерн-блоттинга в культуральной среде, описанного ниже.

Для получения дополнительных характеристик полипептидов по настоящему изобретению, содержащих дополнительные цистеиновые остатки, образцы надосадочной жидкости культуры анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением протоколов, общепринятых в данной области техники. Для целей выявления применяли поликлональное антитело, направленное к белку HA H1N1 (A/California/04/2009). Для тримера с дисульфидными связями в невосстанавливающих условиях, т.е. в случае, когда дисульфидные мостики находятся в неизменном состоянии, ожидается полоса белка при ~90 кДа или более (в зависимости от степени гликозилирования), тогда как в восстанавливающих условиях ожидается полоса, близкая к 35 кДа (соответствующая гликозилированному мономерному полипептиду по настоящему изобретению). На фиг. 22 показаны результаты для полипептидов по настоящему изобретению, полученных из HA штаммов H1N1 A/Texas/(SEQ ID NO: 208), H1N1 A/New York/629/95 (SEQ ID NO: 210), H1N1 A/California/07/09 (SEQ ID NO: 203) и H1N1 A/AA_Marton/1943 (SEQ ID NO: 214). Вестерн-блоттинг в восстанавливающих условиях демонстрирует, что все четыре полипептида по настоящему изобретению экспрессируются, хоть и на различных уровнях, при этом наиболее высокая экспрессия наблюдается для полученного из H1N1 A/California/07/09 полипептида по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 203), а наиболее низкая для полученного из H1N1 A/AA_Marton/1943 полипептида (SEQ ID NO: 214). В этих условиях полипептиды прогоняются в геле в виде мономеров подобно очищенному тримерному s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186), содержащему дополнительную С-концевую последовательность His-метки (EGRHHHHHHH). В невосстанавливающих условиях полоса между 100 и 150 кДа, указывающая на наличие тримерного полипептида по настоящему изобретению, наблюдается для всех полипептидов по настоящему изобретению (в том числе s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186)). Для полипептида, полученного из H1N1 A/AA_Marton/1943 (SEQ ID NO: 214), мономерная полоса больше не является видимой, и на ожидаемой высоте для тримера появляется полоса, хоть и имеющая низкую интенсивность по причине более низкой экспрессии данного полипептида. В дополнение, также можно наблюдать димерные формы, прогоняемые при приблизительно 75 кДа. Полипептиды по настоящему изобретению являются в некоторой степени неоднородными по размеру по причине изменчивости степени гликозилирования отдельных полипептидов по настоящему изобретению.

Для дополнительного подтверждения наличия нейтрализующих эпитопов CR6261 и CR9114 образцы надосадочной жидкости культуры анализировали посредством ELISA. Во-первых, для захвата экспрессируемых полипептидов непосредственно из культуральной среды применяли планшеты, покрытые антителом, направленным на His-метку в растворимых полипептидах по настоящему изобретению. Во-вторых, добавляли CR9114 или CR6261, и для выявления связывания CR9114 или CR6261 с полипептидами по настоящему изобретению применяли антитело козы к иммуноглобулинам человека, конъюгированное с HRP. В качестве положительного контроля в анализ включали растворимый очищенный полноразмерный HA H1N1 A/Brisbane/59/2007 в тримерной и мономерной формах (фиг. 21B, C). В качестве отрицательного контроля также проводили ELISA с применением mAb CR8020, специфичного к HA из группы 2. Результаты показаны на фиг. 21D. Полипептиды по настоящему изобретению демонстрируют четкий ответ в ELISA с CR9114 и CR6261, при этом наиболее высокий уровень ответа наблюдается для полипептида, полученного из A/California/07/09 (SEQ ID NO: 203). Очищенный растворимый полноразмерный HA (как мономерный, так и тримерный) также демонстрирует сильные ответы. Как и ожидалось, в ELISA с CR8020 ответ не наблюдался, что подтверждало специфичность связывания CR6261 и CR9114 с полипептидами по настоящему изобретению.

В заключение, вышеуказанные результаты демонстрируют, что полипептиды по настоящему изобретению, полученные из последовательностей HA H1, описанных выше, могут образовывать тримерные молекулы и содержат нейтрализующие эпитопы CR6261 и CR9114.

Пример 14. Разработка дополнительных полипептидов по настоящему изобретению на основе HA штаммов вируса гриппа из группы 1.

В примерах 1-13 описаны полипептиды по настоящему изобретению на основе HA H1N1. Сходные полипептиды также можно разработать на основе HA других штаммов вируса гриппа из группы 1, например, тех, которые содержат HA H2, H5 и H9. Эти полипептиды также включены в настоящее изобретение. Неограничивающими примерами таких штаммов являются, например, H2N2 A/Adachi/2/1957,

H2N2 A/Singapore/1/1957, H5N1 A/Vietnam/1203/2004 и H9N2 A/Hong Kong/69955/2008. Таким образом, следуя процедурам, изложенным в общих чертах выше, создавали полипептиды по настоящему изобретению, содержащие сконструированные дисульфидные мостики между цистеиновыми остатками в положениях 411 и 419 (кластер 18), описанные под SEQ ID NO: 218-221, SEQ ID NO: 223-226, SEQ ID NO: 228-231 и SEQ ID NO: 233-236.

Следует отметить, что полноразмерный HA H5N1 A/Vietnam/1203/2004 (SEQ ID NO: 227) содержит многоосновный участок расщепления, т.е. последовательность RRRKTR в положениях 341-346 в SEQ ID NO: 227, расположенную непосредственно перед последовательностью пептида слияния. В полипептидах 228-231 по настоящему изобретению многоосновный участок расщепления был удален и замещен одним глутаминовым (Q) остатком с удалением полного участка расщепления. Эти последовательности также охватываются настоящим изобретением.

SEQ ID NO: 219, 221, 224 и 226 содержат дополнительные мутации в положениях 407 и 414-416 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1; следует отметить, что в последовательностях H2 остатки в положениях 9, 10 и 139 подвергнуты делеции по сравнению с SEQ ID NO: 1) для создания последовательности В-петли согласно SEQ ID NO: 8, за исключением остатка 418, который представляет собой цистеин.

SEQ ID NO: 230 и 231 содержат дополнительные мутации в положениях 407 (E407T) и 415 (N415S) (нумерация согласно SEQ ID NO: 1). Эти мутации обеспечивают создание В-петли согласно SEQ ID NO: 8, за исключением остатка 418, который представляет собой цистеин. SEQ ID NO: 236 и 236 были дополнительно модифицированы таким образом, чтобы содержать последовательность MNTQYTAIG-CEYNKSE (т.е. последовательность согласно SEQ ID NO: 8, за исключением остатка 418, который представляет собой цистеин).

Пример 15. Разработка стабилизированных дисульфидными связями тримеров по настоящему изобретению на основе HA штаммов вируса гриппа из группы 2.

В примерах 1-14 описаны полипептиды по настоящему изобретению на основе HA штаммов из группы 1. Полипептид с дисульфидными поперечными связями также можно разработать на основе последовательностей HA из группы 2, таких как, например, H3 и H7. Эти полипептиды также включены в настоящее изобретение. Неограничивающими примерами таких штаммов являются, например, H3N2 A/Hong Kong/1/1968 и H7.

Одним из способов улучшения представления нейтрализующих эпитопов на иммуногене в вакцине является конструирование дополнительных взаимодействий между мономерными иммуногенами с целью создания мультимерной молекулы с увеличенной стабильностью по сравнению с мономером. Недостаток данного способа заключается в том, что при объединении мономерных иммуногенов важные эпитопы могут потенциально закрываться следующим протомером. Поэтому во избежание этого следует проявлять осторожность.

В данном документе авторы настоящего изобретения описывают модифицированные полипептиды по настоящему изобретению, которые образуют стабильные тримеры в растворе, оставляя при этом доступными эпитопы нейтрализующих mAb CR8020 и CR8043.

Для образования тримерного полипептида по настоящему изобретению разрабатывали стабилизирующие взаимодействия, способствующие тримеризации мономерных молекул стеблевых полипептидов на основе HA, сосредоточивая особое внимание на создании ковалентных дисульфидных мостиков между отдельными мономерами в тримере. Для этого трехмерную структуру FL HA H3N2 A/Hong Kong/1/1968 (PDB: 3SDY) анализировали для идентификации зон, в которых близость другого мономера и особенности конформации белка потенциально могут обеспечивать возможность образования межмономерного дисульфидного мостика.

Идентифицировали шесть пар остатков (табл. 11). Проявляли осторожность для обеспечения того, чтобы в каждой паре остатки располагались в разных протомерах (мономерных) в тримерной структуре. Эквиваленты этих остатков (определенные по выравниванию последовательностей) в полипептидах стеблевого домена из группы 2 затем подвергают мутации замены на цистеин для создания полипептидов по настоящему изобретению так, чтобы можно было образовать полипептиды, ковалентно соединенные посредством образования дисульфидных мостиков. С учетом симметрии 3 порядка тримерной молекулы HA успешные разработки приводят к образованию трех межпротомерных дисульфидных мостиков, ковалентно присоединяющих каждый из мономеров тримера к двум другим мономерам.

В WO2013/079473 описаны полипептиды стеблевого домена на основе HA штаммов из группы 2, способные к связыванию с нейтрализующими антителами широкого спектра действия CR8020, CR8043. Пары остатков, соединенных дисульфидными связями, из табл. 11 вводили в полипептид H3 HK-mini2a-linker+cl9+10+11+12+GCN4T (SEQ ID NO: 238 в данном документе; SEQ ID NO: 130 в WO2013/079473) и H3 HK-mini2a-linker+cl9+10+11+12+GCN4T-CG7-1 (SEQ ID NO: 239 в данном документе; SEQ ID NO: 174 в WO2013/079473), полученные из HA H3N2 A/Hong Kong/1/1968 (SEQ ID NO: 237), для получения полипептидов 240-251 по настоящему изобретению.

Последовательности SEQ ID NO: 240-251 содержат лидерную последовательность HA. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в зрелом белке лидерная последовательность была отщеплена и больше не присутствует. Процессированные последовательности также включены в настоя-

щее изобретение.

Растворимые формы полипептидов по настоящему изобретению можно создать посредством делеции С-концевой трансмембранной области и цитоплазматического домена. Делеция может охватывать, например, остатки от 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536 или 537 до С-конца. Эти полипептиды также включены в настоящее изобретение. В некоторых случаях можно добавить С-концевую тримеризационную последовательность, необязательно присоединяемую посредством короткого линкера, необязательно содержащего участок протеолитического расщепления. Примером тримеризационного домена является последовательность фолдона SEQ ID NO: 3. Процессированные последовательности также включены в настоящее изобретение.

Пример 16. Подтверждение достоверности модели контрольного заражения NHP pH1N1 для применения в оценке профилактической эффективности противогриппозной вакцины и иммуногенности и профилактической эффективности mini-NA H1 № 4900 у NHP.

Чтобы иметь возможность изучать иммуногенность и профилактическую эффективность вакцин-кандидатов на UFV в альтернативной модели, в BPRC (Рейсвейк, Нидерланды) предварительно сформировали модель контрольного заражения приматов, отличных от человека (NHP), на макаках-крабоедах (*Macaca fascicularis*) с применением пандемического штамма H1N1 (A/Mexico/InDRE4487/2009). Данная модель основана на модели, опубликованной в литературе Safronetz et al. (2011) J Virol. 85:1214. Тем не менее, необходимо было установить, можно ли применять модель для оценки профилактической эффективности противогриппозных вакцин.

Основными целями данного исследования были:

а) оценка того, можно ли предварительно сформированную модель контрольного заражения pH1N1 на макаках-крабоедах применять для измерения опосредованной вакциной профилактической эффективности при применении сезонной вакцины (Inflexal® V, сезон 2013/2014; инфлексал 13/14), содержащей 15 мкг FL HA штамма H1N1, гомологичного штамму, применяемому для контрольного заражения;

б) оценка иммуногенности s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186) у приматов, отличных от человека.

Второстепенной целью была оценка профилактической эффективности s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186) в данной модели контрольного заражения NHP pH1N1.

Группу самцов макаков-крабоедов подвергали предварительному скринингу на наличие сывороточных антител к альфа-герпесвирусу, STLV, SIV, SRV и NP вируса гриппа А, HAI-титров антител к вирусу для контрольного заражения (допуская максимальный титр 1/10), а также тестировали на туберкулез с помощью пробы Манту и анализа крови. Некоторые подвергнутые скринингу животные составляли часть предыдущего РК-исследования CR8020. После скрининга подходящих животных произвольным образом распределяли в 3 группы по 6 животных в каждой с помощью рандомизированного блочного плана с учетом возраста, веса, HAI-титра и включения в РК-исследование. Внутривенно имплантировали устройства регистрации данных, измеряющие температуру тела с интервалом в 15 мин, с последующим 1-месячным восстановительным периодом, после которого начинался режим иммунизации. Одна группа получала 2 внутримышечные (i.m.) иммунизации человеческой дозой (0,5 мл) инфлексала V 13/14, содержащей 15 мкг FL HA H1N1 A/California/07/09, что является официально установленным режимом иммунизации для ранее не получавших вакцину детей, поддерживаемым учреждениями здравоохранения (CDC, RIVM). Вторая группа получала 3 i.m. иммунизации 150 мкг белка s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186; содержащего дополнительную His-метку) с 50 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M в объеме 0,5 мл. Третья группа представляла собой группу отрицательного контроля, которой 3 раза вводили i.m. 0,5 мл PBS. Все иммунизации проводили с интервалом в 4 недели между иммунизациями. Через четыре недели после заключительных иммунизаций животных подвергали внутрибронхиальному контрольному заражению 4×10^6 TCID₅₀ H1N1 A/Mexico/InDRE4487/2009, что представляло собой дозу, установленную в ходе постановки модели. В течение 21-дневного периода последующего наблюдения ежедневно регистрировали клинические признаки. Животных анестезировали в дни 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14 и 21, в течение которых измеряли вес тела, отбирали мазки из трахей для определения вирусной нагрузки посредством qPCR. В конце исследования устройства регистрации данных удаляли, и данные анализировали.

Для проверки иммуногенности вводимых вакцин сыворотку крови выделяли в день иммунизации, а также за 5 дней до контрольного заражения. Для обоих видов вакцинационной обработки анализировали ответ сыворотки крови до контрольного заражения в отношении широты спектра связывания с панелью FL HA вируса гриппа А из группы 1 и 2, способность вакцин индуцировать выработку антител, связывающихся в непосредственной близости с эпитопом CR9114, с помощью конкурентного ELISA с применением CR9114, выражая ответ в виде % конкуренции, активность ADCC поствакцинальных антител в модели (см. ниже) и нейтрализующую активность поствакцинальных антител с помощью как анализа микронейтрализации гетеросубтипического H5N1 A/HK/156/97, так равно и HAI-анализа, в котором выявляют нейтрализацию вируса, опосредованную эпитопами головного домена FL HA, с применением H1N1 A/California/07/09. Последний штамм является гомологичным вакцинному штамму и штамму для контрольного заражения.

Активность ADCC в модели определяли с применением эффекторных клеток для биологического анализа ADCC (стабильных клеток Jurkat, экспрессирующих Fc-гамма-рецептор IIIA (FcγRIIIA) человека, CD3γ человека и элемент отклика на NFAT, регулирующий репортерный ген люциферазы (Promega)), и клеток-мишеней A549, транзистентно трансфицированных ДНК, кодирующей FL HA штаммов H1N1 и H5N1.

Результаты.

Значимые различия для AUC вирусной нагрузки в трахеях между группами обработки не наблюдались (не показано).

Значимые различия наблюдались в отношении увеличения температуры тела (лихорадки) после контрольного заражения между группой полипептида SEQ ID NO: 186 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M и PBS в течение интервалов из дней 0-3 ($p=0,010$) и дней 0-8 ($p=0,047$) (фиг. 27).

Значимые различия наблюдались в отношении увеличения температуры тела после контрольного заражения между группой инфлекса 13/14 и группой с PBS в течение интервалов из дней 0-3 ($p=0,033$) (фиг. 27).

Вес тела и клинические признаки не были информативными по причине слабой выраженности симптомов, вероятно, обусловленной главным образом повторной анестезией, и поэтому не показаны.

Животное J0403061 (группа инфлекса 13/14) умерло в день 8 после контрольного заражения. При вскрытии, выполненном ветеринаром-патологоанатомом, в качестве причины смерти была определена вирусная пневмония, что согласовалось с высокой вирусной нагрузкой в трахее вплоть до момента наступления смерти.

Режим иммунизации 3×150 мкг полипептида SEQ ID NO: 186 по настоящему изобретению + 50 мкг Matrix-M был иммуногенным:

индукция выработки антител, связывающихся с HA из группы 1 (фиг. 23);

индукция выработки антител, конкурирующих с CR9114, к 3 различным белкам HA из группы 1 (фиг. 24);

индукция выработки антител, нейтрализующих гетеросубтипический штамм H5N1, с применением анализа микронейтрализации (фиг. 26);

индукция выработки антител, способных осуществлять эффекторные функции ADCC, с применением 3 различных белков HA из группы 1 в качестве HA-мишени (фиг. 25).

Вывод.

Демонстрация опосредованного вакциной вмешательства при заболевании в модели контрольного заражения вирусом гриппа H1N1 на макаках-крабоедах была только частично успешной, поскольку в первые 3 дня после контрольного заражения значительно ослабевала только лихорадка. Три иммунизации 3×150 мкг mini-HA H1 № 4900 + 50 мкг Matrix-M являются иммуногенными у приматов, отличных от человека. Индуцированные антитела способны к связыванию с HA и осуществлению эффекторных функций ADCC в отношении всех тестируемых полноразмерных HA из группы 1, а также к нейтрализации гетеросубтипического штамма H5.

Пример 17. Защита от летального контрольного заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97 посредством пассивного переливания сыворотки крови от мышей, иммунизированных полипептидами по настоящему изобретению.

Для определения вклада антител, индуцированных полипептидами по настоящему изобретению, в наблюдаемую защиту проводили исследования по переливанию сыворотки крови.

Целью данного исследования было определение того, придает ли пассивное переливание (многократное дозирование) сыворотки крови от мышей, иммунизированных три раза s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186) в присутствии Matrix-M, защиту от летального контрольного заражения вирусом гриппа H5N1 A/Hong Kong/156/97.

Группы самок мышей-доноров BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели 30 мкг s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186), содержащего C-концевую His-метку, с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M или иммунизировали PBS. Через четыре недели после последней иммунизации (день 70) сыворотку крови выделяли, объединяли в каждой группе и переливали мышам-реципиентам (самки BALB/c, возраст 6-8 недель, $n=10$ на группу). Каждая мышь получала 400 мкл сыворотки крови i.p. в три последовательных дня до контрольного заражения (дни -3, -2 и -1). В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения вводили CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения ($n=8$), при этом инъекция PBS служила в качестве отрицательного контроля ($n=8$). В день 0 мышей подвергали контрольному заражению $12,5 \times LD_{50}$ H5N1 A/Hong Kong/156/97 и отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель. Для проверки иммуногенности вариантов mini-HA H1 у мышей-доноров и определения уровней HA-специфичных антител после переливания сыворотки крови мышам-реципиентам объединенные образцы сыворотки терминальной крови (день 70) мышей-доноров, объединенные образцы сыворотки крови ранее не участвовавших в эксперименте мышей-реципиентов до переливания сыворотки крови (день -

4), а также отдельные образцы сыворотки крови мышей-реципиентов после 3 переливаний сыворотки крови непосредственно перед контрольным заражением (день 0) тестировали в ELISA на связывание с FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07.

Результаты.

Процентные значения выживаемости для экспериментальных групп приведены в табл. 12.

Эксперимент является достоверным; все мыши в контрольной группе с PBS погибают от инфекции в день 13 после контрольного заражения или до него (медианное значение 9,5 дней), тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена ($p < 0,001$).

Три переливания сыворотки крови от мышей, иммунизированных s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 186) с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M, ранее не участвовавшим в эксперименте мышам-реципиентам приводят к значимому увеличению доли выживших ($p < 0,001$) (фиг. 28A), увеличению продолжительности выживания ($p < 0,001$) (фиг. 28A), уменьшению потери веса тела ($p < 0,001$) (фиг. 28B) и снижению клинических показателей ($p < 0,001$) (не показано) по сравнению с контрольной группой PBS для переливания сыворотки крови.

Титры антител, специфичных к FL HA A/Brisbane/59/07, после трех переливаний сыворотки крови сходны с уровнями, полученными после активной иммунизации (фиг. 29).

Вывод.

Компоненты сыворотки крови (наиболее вероятно, антитела), индуцируемые 3-кратной иммунизацией mini-HA H1 № 4900 с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M, являются достаточными для защиты мышей от летального контрольного заражения гетеросубтипическим H5N1 A/Hong Kong/156/97.

Пример 18. Оценка профилактической эффективности в мышинной модели летального заражения H1N1 A/Brisbane/59/07.

С целью приведения дополнительных данных в пользу применения полипептидов по настоящему изобретению в качестве вакцин оценивали профилактическую эффективность трех дополнительных полипептидов против летального контрольного заражения гриппом. Для этого полипептиды SEQ ID NO: 203 и 254 по настоящему изобретению (оба из которых содержат С-концевые His-метки) транзientно экспрессировали в клетках HEK293F и очищали согласно описанному выше. В дополнение, полипептид SEQ ID NO: 186 по настоящему изобретению (также содержащий дополнительную С-концевую His-метку) экспрессировали в клетках насекомых SF9, следуя процедурам, хорошо известным специалистам в данной области техники (см., например, M. Cox, Development of an influenza virus vaccine using the baculovirus-insect cell expression system, PhD thesis, Wageningen University Dec 2009), и очищали согласно описанному выше.

Целью данного исследования было определение профилактической эффективности полипептидов по настоящему изобретению с Matrix-M в модели контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07 по сравнению с контрольной группой с PBS.

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели 30 мкг полипептида по настоящему изобретению с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения вводили CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения ($n=8$), при этом инъекция PBS служила в качестве отрицательного контроля ($n=16$). Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 12,5×LD₅₀ вируса для контрольного заражения и отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель.

Для проверки иммуногенности полипептидов по настоящему изобретению образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестировали в анализах ELISA на связывание с FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли антитела, индуцированные полипептидом по настоящему изобретению, в непосредственной близости с эпитопом для CR9114, проводили конкурентный ELISA с применением CR9114. Данные о конкуренции представляли в виде "% конкуренции", определяемого как $(A-P)/A \times 100$, где A представляет собой максимальный OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в отсутствие сыворотки крови, а P представляет собой OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в присутствии сыворотки крови в указанном разведении, или выражали с применением показателя наклона OD, с помощью которого можно количественно оценить ответы.

Результаты.

Процентные значения выживаемости для экспериментальных групп приведены в табл. 12.

Эксперимент является достоверным; все мыши в контрольной группе с PBS ($n=16$) погибают от инфекции в день 10 после контрольного заражения или до него (медианное значение 8 дней), тогда как группа положительного контроля ($n=8$, 15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена ($p < 0,001$).

Три иммунизации полипептидами SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводят к значимому увеличению доли вы-

живших ($p < 0,001$) (фиг. 30A), увеличению продолжительности выживания ($p < 0,001$) (фиг. 30A), уменьшению потери веса тела ($p < 0,001$) (фиг. 30B) и снижению клинических показателей ($p < 0,001$) (не показано) по сравнению с контрольной группой с PBS.

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных полипептидами по настоящему изобретению, до контрольного заражения являются значимо более высокими по сравнению с PBS для всех тестируемых полипептидов по настоящему изобретению ($p < 0,001$) (фиг. 31A).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 выходят на плато после двух иммунизаций для всех тестируемых полипептидов по настоящему изобретению (не показано).

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M индуцируют значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ($p < 0,001$) (фиг. 31B).

Полипептид SEQ ID NO: 203 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (происходящий из H1N1 A/California/07/2009) индуцирует значимо более низкие уровни антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с другими исследуемыми полипептидами по настоящему изобретению ($p \leq 0,013$) при применении FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в качестве антигена-мишени (фиг. 31B).

Вывод.

Дополнительные полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 204 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M придают защиту от летального контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07.

Пример 19. Оценка профилактической эффективности в мышинной модели летального заражения H1N1 A/NL/602/09.

С целью приведения дополнительных данных в пользу применения полипептидов по настоящему изобретению в качестве вакцин оценивали профилактическую эффективность трех дополнительных полипептидов против летального контрольного заражения гриппом. Для этого полипептиды SEQ ID NO: 203 и 254 по настоящему изобретению (оба из которых содержат С-концевые His-метки) транзientно экспрессировали в клетках HEK293F и очищали согласно описанному выше. В дополнение, полипептид SEQ ID NO: 186 по настоящему изобретению (также содержащий дополнительную С-концевую His-метку) экспрессировали в клетках насекомых SF9, следуя процедурам, хорошо известным специалистам в данной области техники (выше), и очищали согласно описанному выше.

Целью данного исследования было определение профилактической эффективности дополнительных тримерных вариантов mini-HA H1 с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M в модели контрольного заражения H1N1 A/NL/602/09 по сравнению с контрольной группой с PBS.

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели 30 мкг полипептида по настоящему изобретению с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения вводили CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения ($n=8$), при этом инъекция PBS служила в качестве отрицательного контроля ($n=16$). Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению $12,5 \times LD_{50}$ вируса для контрольного заражения и отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель.

Для проверки иммуногенности полипептидов по настоящему изобретению образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестируют в анализах ELISA на связывание с FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли антитела, индуцированные mini-HA, в непосредственной близости с эпитопом для CR9114, проводили конкурентный ELISA с применением CR9114. Данные о конкуренции представляли в виде "% конкуренции", определяемого как $(A-P)/A \times 100$, где A представляет собой максимальный OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в отсутствие сыворотки крови, а P представляет собой OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в присутствии сыворотки крови в указанном разведении, или выражали с применением показателя наклона OD, с помощью которого можно количественно оценить ответы; в качестве эталона включали растворы CR9114 и CR8020 (исходная концентрация 5 мг/мл).

Результаты.

Процентные значения выживаемости для экспериментальных групп приведены в табл. 12.

Эксперимент является достоверным; все мыши в контрольной группе с PBS ($n=16$) погибают от инфекции в день 8 после контрольного заражения или до него (медианное значение 6 дней), тогда как группа положительного контроля ($n=8$, 15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена ($p < 0,001$).

Три иммунизации полипептидами SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводят к значимому увеличению доли выживших ($p \leq 0,004$) (фиг. 32A), увеличению продолжительности выживания ($p \leq 0,001$) (фиг. 32A) и снижению клинических показателей ($p < 0,001$) (не показано) по сравнению с контрольной группой с PBS. Для полипептида SEQ ID NO: 203 по настоящему изобретению также наблюдается значимое уменьше-

ние AUC веса тела ($p < 0,001$) (фиг. 32B).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных полипептидами SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению, являются значимо более высокими по сравнению с PBS ($p \leq 0,001$) (фиг. 33A).

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M индуцируют значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ($p < 0,001$) (фиг. 33B).

Тримерный полипептид SEQ ID NO: 203 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (происходящий из H1N1 A/California/07/2009) индуцирует значимо более низкие уровни антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с вариантами, полученными из H1N1 A/Brisbane/59/2007 ($p \leq 0,002$), при применении FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в качестве антигена-мишени (фиг. 33B).

Вывод.

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M придают защиту от летального контрольного заражения H1N1 A/NL/602/09.

Пример 20. Оценка II тримеров-кандидатов mHA H1 в мышинной модели заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97.

С целью приведения дополнительных данных в пользу применения полипептидов по настоящему изобретению в качестве вакцин оценивали профилактическую эффективность трех дополнительных полипептидов против летального контрольного заражения гриппом. Для этого полипептиды 203 и 254 по настоящему изобретению (оба из которых содержат С-концевые His-метки) транзientно экспрессировали в клетках HEK293F и очищали согласно описанному выше. В дополнение, полипептид SEQ ID NO: 186 по настоящему изобретению (также содержащий дополнительную С-концевую His-метку) экспрессировали в клетках насекомых SF9, следуя процедурам, хорошо известным специалистам в данной области техники, и очищали согласно описанному выше.

Целью данного исследования было определение профилактической эффективности полипептидов SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M в модели контрольного заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97 по сравнению с контрольной группой с PBS.

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели 30 мкг полипептида по настоящему изобретению с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения вводили CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения ($n=8$), при этом инъекция PBS служила в качестве отрицательного контроля ($n=16$). Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 12,5×LD₅₀ вируса для контрольного заражения и отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель.

Для проверки иммуногенности полипептидов SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестируют в анализах ELISA на связывание с FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли антитела, индуцированные mini-HA, в непосредственной близости с эпитопом для CR9114, проводили конкурентный ELISA с применением CR9114. Данные о конкуренции представляли в виде "% конкуренции", определяемого как $(A-P)/(A \times 100)$, где A представляет собой максимальный OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в отсутствие сыворотки крови, а P представляет собой OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в присутствии сыворотки крови в указанном разведении, или выражали с применением показателя наклона OD, с помощью которого можно количественно оценить ответы; в качестве эталона включали растворы CR9114 и CR8020 (исходная концентрация 5 мкг/мл).

Результаты.

Процентные значения выживаемости для экспериментальных групп приведены в табл. 12.

Эксперимент является достоверным; 15 из 16 мышей в контрольной группе с PBS погибают от инфекции в день 9 после контрольного заражения или до него (медианное значение 9 дней), тогда как группа положительного контроля ($n=8$, 15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена ($p < 0,001$).

Три иммунизации полипептидами SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводят к значимому увеличению доли выживших ($p < 0,001$) (фиг. 34A), увеличению продолжительности выживания ($p < 0,001$) (фиг. 34A), уменьшению потери веса тела ($p < 0,001$) (фиг. 34B) и снижению клинических показателей ($p < 0,001$) (не показано) по сравнению с контрольной группой с PBS.

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных полипептидами SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению, являются значимо более высокими по сравнению с PBS ($p \leq 0,001$) (фиг. 35A).

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M индуцируют значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ($p < 0,001$) (фиг. 35B).

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (происходящий из H1N1 A/California/07/2009) индуцирует значимо более низкие уровни антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с полипептидами SEQ ID NO: 186 и 254 по настоящему изобретению (происходящими из H1N1 A/Brisbane/59/2007) при применении FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в качестве антигена-мишени ($p < 0,001$) (фиг. 35B).

Вывод.

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M придают защиту от летального контрольного заражения гетеросубтипическим H5N1 A/Hong Kong/156/97.

Пример 21. Оценка 11 тримеров-кандидатов mHA H1 в мышинной модели заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34.

С целью приведения дополнительных данных в пользу применения полипептидов по настоящему изобретению в качестве вакцин оценивали профилактическую эффективность трех дополнительных полипептидов против летального контрольного заражения гриппом. Для этого полипептиды 203 и 254 по настоящему изобретению (оба из которых содержат С-концевые His-метки) транзистентно экспрессировали в клетках HEK293F и очищали согласно описанному выше. В дополнение, полипептид SEQ ID NO: 186 по настоящему изобретению (также содержащий дополнительную С-концевую His-метку) экспрессировали в клетках насекомых SF9, следуя процедурам, хорошо известным специалистам в данной области техники, и очищали согласно описанному выше.

Целью данного исследования было определение профилактической эффективности полипептидов SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M в модели контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 по сравнению с контрольной группой с PBS.

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели 30 мкг полипептидов SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения вводили CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного заражения ($n=8$), при этом 3 иммунизации PBS служили в качестве отрицательного контроля ($n=16$). Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 25×LD₅₀ вируса для контрольного заражения и отслеживали (выживаемость, вес, клинические показатели) в течение 3 недель.

Для проверки иммуногенности полипептидов по настоящему изобретению образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестируют в анализе ELISA на связывание с FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли антитела, индуцированные mini-HA, в непосредственной близости с эпитопом для CR9114, проводили конкурентный ELISA с применением CR9114. Данные о конкуренции представляли в виде '% конкуренции', определяемого как $(A-P)/A \times 100$, где A представляет собой максимальный OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в отсутствие сыворотки крови, а P представляет собой OD-сигнал связывания CR9114 с FL HA в присутствии сыворотки крови в указанном разведении, или выражали с применением показателя наклона OD, с помощью которого можно количественно оценить ответы; в качестве эталона включали растворы CR9114 и CR8020 (исходная концентрация 5 мкг/мл).

Результаты.

Процентные значения выживаемости для экспериментальных групп приведены в табл. 12.

Эксперимент является достоверным; все мыши в контрольной группе с PBS ($n=16$) погибают от инфекции в день 9 после контрольного заражения или до него (медианное значение 8 дней), тогда как группа положительного контроля ($n=8$, 15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена ($p < 0,001$).

Три иммунизации полипептидами SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводят к значимому увеличению доли выживших ($p < 0,001$) (фиг. 36A), увеличению продолжительности выживания ($p < 0,001$) (фиг. 36A), уменьшению потери веса тела ($p < 0,001$) (фиг. 37B) и снижению клинических показателей ($p < 0,001$) (не показано) по сравнению с контрольной группой с PBS.

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных вариантами mini-HA H1, до контрольного заражения являются значимо более высокими по сравнению с PBS для полипептидов 186, 203 и 254 по настоящему изобретению ($p < 0,001$) (фиг. 37A).

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M индуцируют значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ($p < 0,001$) (фиг. 37B).

Полипептид SEQ ID NO: 203 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогатель-

ного средства Matrix-M (происходящий из H1N1 A/California/07/2009) индуцирует значимо более низкие уровни антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с вариантами на основе H1N1 A/Brisbane/59/2007 при применении FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в качестве антигена-мишени ($p \leq 0,001$) (фиг. 37B).

Вывод.

Полипептиды SEQ ID NO: 186, 203 и 254 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M придают защиту от летального контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34.

Пример 22. Полипептиды по настоящему изобретению с другим происхождением последовательностей H1.

Вслед за s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 181) продуцировали два варианта Tex_s127H1-t2-cl18long и NY_s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 208 и 210), которые обладают такими же конструктивными особенностями, но в основе которых, однако, лежит HA, происходящий из штаммов H1N1 A/Texas/UR06-0526/07 (SEQ ID NO: 205) и A/New York/629/95 (SEQ ID NO: 206). В данном эксперименте в обоих белках присутствуют С-концевой участок расщепления фактором X и 6-гистидиновая метка. Для экспрессии и очистки применяли протокол, сходный с описанным в примере 2, за исключением того, что процедуру начинали с 0,6 л надосадочной жидкости культуры.

Очищенные полипептиды дополнительно анализировали в сэндвич-ELISA (описанном в примере 3) на наличие мультимерных форм полипептидов, представляющих два или более эпитопов для нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114. Вкратце, покрывающее mAb CR9114 применяли для захвата очищенных белков, которые затем инкубировали с биотинилированным CR914 или CR6261, и с помощью стрептавидина, конъюгированного с HRP, определяли связывание. Значения выхода продукта и результаты сэндвич-ELISA для мультимеров показаны в табл. 13.

Результаты, показанные в табл. 13, указывают на то, что все варианты дают в результате мультимерный белок с желаемыми характеристиками связывания. Полипептид Tex_s127H1-t2-cl18 (SEQ ID NO: 208) характеризуется сходным выходом по сравнению с s127H1-t2-cl18long, тогда как полипептид NY_s127H1-t2-cl18 (SEQ ID NO: 210) характеризуется в ~4 раза более низким выходом по сравнению с s127H1-t2-cl18long (SEQ ID NO: 181). Все тестируемые полипептиды были способны к связыванию с CR9114 и CR6261 подобно s127H1-t2-cl18long, как определено посредством ELISA, который указывает на наличие мультимеризации. Взятые в совокупности, результаты, показанные в данном документе, демонстрируют успешное образование стеблевых полипептидов HA с применением последовательности H1 другого филогенетического происхождения.

Пример 23. Полипептиды по настоящему изобретению с дополнительным С-концевым тримеризационным доменом.

Полипептиды по настоящему изобретению можно экспрессировать с разнообразными С-концами. Помимо различной длины (в результате альтернативных усечений трансмембранного домена HA), также можно добавлять метки для выявления и очистки, а также функциональные домены, не влияя на структуру антигена. В описанных ниже конструкциях демонстрируется добавление тримеризационного домена фолдона (фланкированного FLAG- и His-меткой) к коротким (с делецией от остатка 520 до С-конца; нумерация согласно SEQ ID NO: 1) или длинным (с делецией от остатка 520 до С-конца) вариантам полипептидов по настоящему изобретению, полученным из FL HA H1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1) или H1 A/California/07/2009 (SEQ ID NO: 252).

Конструкции подвергали транзientной экспрессии в клетках HEK293F (согласно описанному в примере 2) и исследовали полипептиды по настоящему изобретению, присутствующие в отфильтрованной надосадочной жидкости культуры. Вначале определяли уровни экспрессии и тримеризации с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга (согласно описанному в примере 2, см. фиг. 38). Культуральную среду дополнительно анализировали в сэндвич-ELISA (описанном в примере 3) на наличие мультимерных форм полипептидов, представляющих два или более эпитопов для нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114. Вкратце, покрывающее mAb CR9114 применяли для захвата очищенных белков, которые затем инкубировали с биотинилированным CR914, и с помощью стрептавидина, конъюгированного с HRP, определяли связывание (см. табл. 14). Наконец, проводили гомогенные исследования связывания для подтверждения уровня экспрессии полипептидов по настоящему изобретению, а также для определения их силы связывания с хорошо изученными моноклональными антителами (IgG) с известными эпитопами в стеблевом домене HA. Для данного документа была разработана система AlphaLISA (Perkin Elmer), опирающаяся на использование С-концевых FLAG- и His-меток, а также моноклональных IgG человека CR9114 и CR6261. Все реагенты разводили в буфере, содержащем PBS, 0,05% Tween-20 и 0,5 мг/мл BSA.

Для определения уровня экспрессии с применением системы AlphaLISA отфильтрованные образцы надосадочной жидкости культуры клеток, содержащие полипептиды по настоящему изобретению, разводили в 40 раз в присутствии донорной гранулы с антителом к His и акцепторной гранулы с антителом к FLAG, обе из которых получены от Perkin Elmer, при 10 мкг/мл в конечном объеме 25 мкл. Однородную смесь инкубировали в течение 1 ч при RT. Если как возбужденная донорная гранула (680 нм), так и

акцепторная гранула связываются с соответствующими С-концевыми метками и вступают в непосредственную близость (~100 нм), перенос энергии (образование синглетного кислорода) можно измерить в виде сигнала люминесценции акцепторной гранулы (615 нм). Интенсивность сигнала в данном гомогенном формате анализа прямо пропорциональна количеству белка в растворе. Средние значения интенсивности сигналов в AlphaLISA для экспрессируемых полипептидов по настоящему изобретению показаны в табл. 14.

Взаимодействие между полипептидами по настоящему изобретению и IgG выявляли спустя 1 ч. инкубирования с CR9114 либо CR6261 (конечная концентрация соответственно 1 или 2 нМ в 25 мкл) при RT с применением двух гранул, донорной гранулы с антителом к His, распознающим HA (10 мкг/мл), и акцепторной гранулы с антителом к Fc (10 мкг/мл), распознающим IgG. Спустя дополнительный час инкубирования измеряли сигнал акцепторной гранулы в AlphaLISA. Интенсивность сигнала в данном гомогенном формате анализа прямо пропорциональна силе связывания (аффинности/авидности) между обоими партнерами по связыванию и является, таким образом, мерой целостности и качества эпитопа mini-HA. Средние значения интенсивности сигналов в AlphaLISA для связывания с CR9114 и CR6261 показаны в табл. 14.

Исходные конструкции SEQ ID NO: 164 (происходящая из H1 A/Brisbane/59/2007) и SEQ ID NO: 211 (происходящая из H1 A/California/07/2009) уже содержат тримеризационный домен GCN4, включенный в состав С-спирали. Вставка дополнительного тримеризационного домена фолдона на С-конце растворимых вариантов этих полипептидов (также включенных в настоящее изобретение) возможна и приводит к сходным или лучшим уровням экспрессии. Дополнительный тримеризационный домен может дополнительно улучшать полипептид по настоящему изобретению в том, что касается уровня тримеризации, о чем свидетельствуют результаты вестерн-блоттинга и ELISA для мультимеров. Связывание с нейтрализующими IgG широкого спектра действия CR9114 и CR6261 является таким же или лучшим по сравнению с полипептидами по настоящему изобретению, имеющими только один тримеризационный домен.

Таблица 1

Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3-буквенная	1-буквенная	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

Таблица 2

Выравнивание последовательности для последовательностей H1 согласно специфическим вариантам осуществления настоящего изобретения

1. A/Solomon Islands/6/2003 (H1N1) (SEQ ID NO: 25)
2. A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 1)
3. A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) (SEQ ID NO: 26)
4. A/California/07/2009 (H1N1) (SEQ ID NO: 27)
5. A/swine/Hubei/S1/2009 (H1N1) (SEQ ID NO: 28)

6. A/swine/Haseluenne/IDT2617/2003 (H1N1) (SEQ ID NO: 29)
7. A/NewYork/8/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 30)
8. A/SolomonIslands/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 31)
9. A/NewYork/146/2000 (H1N1) (SEQ ID NO: 32)
10. A/NewYork/653/1996 (H1N1) (SEQ ID NO: 33)
11. A/Beijing/262/1995 (H1N1) (SEQ ID NO: 34)
12. A/Texas/36/1991 (H1N1) (SEQ ID NO: 35)
13. A/Singapore/6/1986 (H1N1) (SEQ ID NO: 36)
14. A/Chile/1/1983 (H1N1) (SEQ ID NO: 37)
15. A/Baylor/11515/1982 (H1N1) (SEQ ID NO: 38)
16. A/Brazil/11/1978 (H1N1) (SEQ ID NO: 39)
17. A/USSR/90/1977 (H1N1) (SEQ ID NO: 40)
18. A/NewJersey/8/1976 (H1N1) (SEQ ID NO: 41)
19. A/Denver/1957 (H1N1) (SEQ ID NO: 42)
20. A/Albany/4835/1948 (H1N1) (SEQ ID NO: 43)
21. A/FortMonmouth/1/1947 (H1N1) (SEQ ID NO: 44)
22. A/Cameron/1946 (H1N1) (SEQ ID NO: 45)
23. A/Weiss/1943 (H1N1) (SEQ ID NO: 46)
24. A/Iowa/1943 (H1N1) (SEQ ID NO: 47)
25. A/Bellamy/1942 (H1N1) (SEQ ID NO: 48)
26. A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) (SEQ ID NO: 49)
27. A/WSN/1933 (H1N1) (SEQ ID NO: 50)
28. A/SouthCarolina/1/1918 (H1N1) (SEQ ID NO: 51)

1. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60

2. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
ENSHNGKLCL 60

3. MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60

4. MKAILVLLY TFATANADTL CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDKHNGKLCK 60

5. MEAKLFLVFC AFTALKADTF CVGYHANYST HTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
ENSHNGKLCS 60

6. MEAKLFLVFC AFTALKADTI CVGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
ENNHNGKLCS 60

7. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60

8. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60

9. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

10. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

11. MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCL 60

12. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

13. MKAKLLVLLC AFTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

14. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDNHNGKLCK 60

15. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

16. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

17. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

18. MKAKLLVLLC AFTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

19. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

20. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

21. MKAKLLVLLC ALTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

22. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

23. MKARLLVLLC ALAATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

24. MKARLLVLLC ALAATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

25. MKARLLVLLC AIAATDADTI CIGYHANNST DTVDITLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

26. MKANLLVLLC ALAAADADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCR 60

27. MKAKLLVLLY AFVATDADTI CIGYHANNST DTVDTIFEKN VAVTHSVNLL
EDRHNGKLCK 60

28. MEARLLVLLC AFAATNADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
EDSHNGKLCK 60

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

1. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISR ESWSYIVEKP NPENGTCYPG
HFADYEELRE 120

2. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP NPENGTCYPG
HFADYEELRE 120

3. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCYPG
YFADYEELRE 120

4. LRGVAPLHLG KCNIAGWILG NPECESLSTA SSWSYIVETP SSDNGTCYPG
DFIDYEELRE 120

5. LNGKIPLQLG NCVAGWILG NPKCDLLTA NSSYIIETS KSKNGACYPG
EFADYEELKE 120

6. LNGKAPLQLG NCVAGWILG NPECDLLTV DSWSYIIETS NSKNGACYPG
EFADYEELRE 120

7. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCYPG
YFADYEELRE 120

8. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISR ESWSYIVEKP NPENGTCYPG
HFADYEELRE 120

9. LKGTAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP NPKNGTCYPG
YFADYEELRE 120

10. LKGTAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP NPENGTCYPG
YFADYEELRE 120

11. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLISK ESWSYIVETP NPENGTCYPG
YFADYEELRE 120

12. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPKCESLFSK ESWSYIAETP NPENGTCYPG
YFADYEELRE 120

13. LKGIAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

14. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

15. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

16. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

17. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

18. LKGIAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

19. LKGKAPLQLG NCNIAGWVLG NPECESLLSN RSWSYIAETP NSENGTCYPG
DFADYEELRE 120

20. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLFSK KSWSYIAETP NSENGTCYPG
YFADYEELRE 120

21. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSK RSWSYIAETP NSENGACYPG
DFADYEELRE 120

22. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSK RSWSYIAETP NSENGACYPG
DFADYEELRE 120

23. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVEIP NSENGTCYPG
DFTDYEELRE 120

24. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVETP NSENGTCYPG
DFIDYEELRE 120

25. LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVETP NSENGTCYPG
DFIDYEELRE 120

26. LKGIAPLQLG KCNIAGWLLG NPECDLLPV RSWSYIVETP NSENGICYPG
DFIDYEELRE 120

27. LKGIAPLQLG KCNITGWLLG NPECDSLLPA RSWSYIVETP NSENGACYPG
DFIDYEELRE 120

28. LKGIAPLQLG KCNIAGWLLG NPECDLLLTA SWSYIVETS NSENGTCYPG
DFIDYEELRE 120

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

1. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTTT-GVS ASCSHNGESS FYKNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

2. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVS ASCSHNGESS FYRNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

3. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVS ASCSHNGKSS FYRNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

4. QLSSVSSFER FEIFPKTSSW PNHDSNKGVT AACPHAGAKS FYKNLIWLVK
KNGSYPKLSK 180

5. QLSTVSSFER FEIFPKAISW PDHDATRGTT VACSHSGVNS FYRNLLSTVK
KNGSYPKLSK 180

6. QLSTVSSFER FEIFPKATSW PNHDTTRGTT ISCSHSGANS FYRNLLWIVK
KNGSYPKLSK 180

7. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVS ASCSHNGKSS FYRNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

8. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTTT-GVS ASCSHNGESS FYKNLLWLTG
KNGLYPNLSK 179

9. QLSSVSSFER FEIFPKDSSW PNHTVTKGVT ASCSHNGKSS FYKNLLWLTE
KNGLYPNLSK 180

10. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHNGKSS FYKNLLWLTE
KNGLYPNLSK 180

11. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVT-GVT ASCSHNGKSS FYRNLLWLTE
KNGLYPNLSN 179

12. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT TSCSHNGKSS FYRNLLWLTK
KNGLYPNVSK 180

13. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHKGRSS FYRNLLWLTK
KNGSYPNLSK 180

14. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHNVTRGVT AACSHKGKSS FYRNLLWLTE
KNGSYPNLSK 180

15. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHSVTRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE
KNGSYPNLSK 180

16. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE
KNGSYPNLSK 180

17. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNVTRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE
KNGSYPNLSK 180

18. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHKGRSS FYRNLLWLTK
KNGSYPNLSK 180

19. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PNHTTR-GVT AACPHARKSS FYKNLVWLTE
ANGSYPNLSR 179

20. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT AACSHKGKSS FYRNLLWLTE
KNGSYPNLNK 180

21. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT AACSHAGKSS FYKNLLWLTE
TDGSYPKLSK 180

22. QLSSVSSFER FEIFPKGRSW PEHNIDIGVT AACSHAGKSS FYKNLLWLTE
KDGSYPNLNK 180

23. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHNTARGVT AACSHAGKSS FYRNLLWLTE
KDGSYPNLKN 180

24. QLSSVSSFER FEIFSKESSW PKHTTG-GVT AACSHAGKSS FYRNLLWLTE
KDGSYPNLNN 179

25. QLSSVTSFER FEIFPKETSW PKHNTTKGVT AACSHAGKCS FYRNLLWLTE
KDGSYPNLNN 180

26. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHNTN-GVT AACSHAGKSS FYRNLLWLTE
KEGSYPKLKN 179

27. QLSSVSSLER FEIFPKESSW PNHTFN-GVT VSCSHRGKSS FYRNLLWLTK
KGDSYPKLTN 179

28. QLSSVSSFKEK FEIFPKTSSW PNHETTKGVT AACSYAGASS FYRNLLWLTK
KGSSYPKLSK 180

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

1. SYANNKEKEV LVLWGVHHPP NIGDQRALYH KENAYVSVVS SHYSRKFTPE
IAKRPKVRDQ 239

2. SYANNKEKEV LVLWGVHHPP NIGNQKALYH TENAYVSVVS SHYSRKFTPE
IAKRPKVRDQ 239

3. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPP NIGNQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 239

4. SYINDKGKEV LVLWGIHHPS TSADQQSLYQ NADAYVSVG SRYSKKFKPE
IAIRPKVRXX 240

5. SYTNNKGKEV LVIWGVHHPP TDSVQQTLYQ NKHTYVSVG SKYYKRFTPE
IVARPKVRGQ 240

6. SYTNNKGKEV LVIWGVHHPP TDSDQQTLYQ NNHTYVSVG SKYYQRFTPE
IVTRPKVRGQ 240

7. SYANNKEKEV LVLWGVHHPP NIGDQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 239

8. SYANNKEKEV LVLWGVHHPP NIGDQRALYH KENAYVSVVS SHYSRKFTPE
IAKRPKVRDQ 239

9. SYVNKKGKEV LVLWGVHHPS NMGDQRAIYH KENAYVSVLS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240

10. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
ITKRPKVRDQ 240

11. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIRDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRGQ 239

12. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240

13. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240

14. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRNQ 240

15. SYVNDKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240

16. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAKRPKVRGQ 240

17. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 240

18. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 240

19. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEEQRALYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAKRPKVRDQ 239

20. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 240

21. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 240

22. SYVNNKEKEV LILWGVHHP NIENQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 240

23. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP SIKEQQTIYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRDQ 240

24. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIKDQQTIYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 239

25. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP NIKDQQTIYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE
IAERPVRGQ 240

26. SYVNNKEKEV LVLWGIHHP NSKEQQNLIYQ NENAYVSVVT SNYNRRFTPE
IAERPVRDQ 239

27. SYVNNKEKEV LVLWGVHHP SSDEQQSLY NGNAYVSVAS SNYNRRFTPE
IAARPVKDQ 239

28. SYVNNKGKEV LVLWGVHHP TGTDDQSLYQ NADAYVSVGS SKYNRRFTPE
IAARPKVRDQ 240

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

1. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRY AFALSRGFGS GIINSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

2. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRY AFALSRGFGS GIINSNAPMD
KCDAKCQTPQ 299

3. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

4. EGRMYYWTL VEPGDKITFE ATGNLVVPRY AFAMERNAGS GIIISDTPVH
DCNTTCQTPK 300

5. AGRMYYWTL FDQGDITIFE ATGNLIAPWH AFALKKGSSS GIMLSDAQVH
NCTTKCQTPH 300

6. AGRMYYWTL LDQGDITIFE ATGNLIAPWH AFALNKGPS GIMISDAVH
NCTTKCQTPH 300

7. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRF AFALSRGFGS GIITSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

8. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRY AFALSRGFGS GIINSNAPMD
ECDAKCQTPQ 299

9. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIIISNASMG
ECDAKCQTPQ 300

10. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMG
ECDAKCQTPQ 300

11. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNAPMN
ECDAKCQTPQ 299

12. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

13. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

14. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

15. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNVSM
ECDAKCQTPQ 300

16. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

17. AGRINYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWH AFALNRGFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

18. EGRINYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDAKCQTPQ 300

19. SGRMNYWTL LEPGDTIIFE ATGNLIAPWY AFALSRGPGS GIITSNAPLD
ECDTKCQTPQ 299

20. AGRINYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWH AFALSRGFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

21. AGRINYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRDFGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

22. AGRINYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALNRGIGS GIITSNASMD
ECDTKCQTPQ 300

23. AGRMNYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH
ECDTKCQTPQ 300

24. AGRINYWTL LKPGDTIMFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH
ECDTKCQTPQ 299

25. AGRMNYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH
ECNTKCQTPQ 300

26. AGRMNYWTL LKPGDTIIFE ANGNLIAPMY AFALRRGFGS GIITSNASMH
ECNTKCQTPQ 299

27. HGRMNYWTL LEPGDTIIFE ATGNLIAPWY AFALSRGFES GIITSNASMH
ECNTKCQTPQ 299

28. AGRMNYWTL LEPGDTITFE ATGNLIAPWY AFALNRGSGS GIITSDAPVH
DCNTKCQTPH 300

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

1. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSALKR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

2. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSALKR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

3. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSALKR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

4. GAINSSLPFQ NIHPITIGEC PKYVKSTKLR LATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

5. GALKNNLPLQ NVHLFTIGEC PKYVKSTQLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGRTG 360

6. GALKSNLPFQ NVHPSTIGEC PKYVKSTQLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

7. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSAKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

8. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSAKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

9. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNVPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

10. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

11. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

12. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

13. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

14. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

15. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

16. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

17. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

18. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

19. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS VQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

20. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

21. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVKSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

22. GAINSSLPFQ NIHPFTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWDG 360

23. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

24. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

25. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

26. GAINSSLPYQ NIHPVTIGEC PKYVRSAKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

27. GSINSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQYRGLFGAI
AGFIEGGWTG 359

28. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI
AGFIEGGWTG 360

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

1. MVDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

2. MVDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

3. MVDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

4. MVDGWYGYHH QNEQGSYAA DLKSTQNAID EITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNHLEKR 420

5. MIDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQIAID GINNKANSVI GKMNIQLTSV
GKEFNSLEKR 420

6. MIDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQIAID GINNKVNSII EKMNTQFTSV
GKEFNDLEKR 420

7. MVDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

8. MVDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

9. MIDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSII EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

10. MIDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAID GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 420

11. MMDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 419

12. MIDGWYGYHH QNEQGSYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLERR 420

13. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

14. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSII EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

15. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

16. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

17. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

18. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

19. MMDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 419

20. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

21. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN WITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

22. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNKLEKR 420

23. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 420

24. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 419

25. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 420

26. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNIQFTAV
GKEFNKLEKR 419

27. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 419

28. MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAID GITNKVNSVI EKMNTQFTAV
GKEFNNLEKR 420

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

1. MENLNKKVDD GFIDIWYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

2. MENLNKKVDD GFIDIWYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

3. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

4. IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDYHDSNVK NLYEKVRSQ
KNNAKEIGNG 480

5. KENLNKTVDD RFLDVWTFNA ELLVLEENQR TLEFHDLNIK SLYEKVKSHL
RNNDKEIGNG 480

6. IENLNKKVDD GFLDVWTFNA ELLILLENER TLDHDFNVK NLYEKVKSQ
RNNAKEIGNG 480

7. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

8. MENLNKKVDD GFIDIWYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

9. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDLNVK NLYEKVKNQ
KNNAKEIGNG 480

10. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKTQ
KNNAKEIGNG 480

11. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

12. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENGR TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

13. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

14. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

15. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

16. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

17. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

18. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

19. MENLNKKVDD GFMDIWTYNA ELLVLENER TLDHDSNVK NLYEKVKNQ
RNNAKELGNG 479

20. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

21. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 480

22. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 480

23. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLILLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL
RNNAKEIGNG 480

24. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL
RNNAKEIGNG 479

25. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
RNNAKEIGNG 480

26. MENLNNKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

27. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER TLDFHDLNVK NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 479

28. IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER TLDFHDSNVR NLYEKVKSQ
KNNAKEIGNG 480

. * * * * . * * * * * * . * * * * * * * * * * . * * * * * * * * . * * * * .
 * * * * * . * * . * * * * * . * * *

1. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

2. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

3. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

4. CFEFYHKCDN TCMESVKNGT YDYPKYSEEA KLNREEIDGV KLESTRIYQI
LAIYSTVASS 540

5. CFEFYHKRDN ECLECVKNGT YNPKYSEES KFNREEIVGV KLESMGIHQI
LAIYSTVASS 540

6. CFEFYHKCDN ECMESVKNGT YNPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVHQI
LAIYSTVASS 540

7. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNRRERIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

8. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

9. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSKES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

10. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

11. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

12. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNRGKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

13. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

14. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

15. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

16. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

17. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

18. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

19. CFEFYHCCDN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYRI
LAIYSTVASS 539

20. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

21. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

22. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKFSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

23. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

24. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTAASS 539

25. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

26. CFEFYHCCDN ECMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREKVDGV KLESMGIYQI
LAIYSTVASS 539

27. CFEFYHKCDN ECMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 539

28. CFEFYHKCDD ACMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREEIDGV KLESMGVYQI
LAIYSTVASS 540

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

1. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
2. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
3. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
4. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
5. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRVCI 566
6. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
7. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
8. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
9. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
10. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
11. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
12. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
13. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
14. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
15. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
16. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
17. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
18. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
19. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
20. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
21. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
22. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
23. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
24. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
25. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566
26. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
27. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 565
28. LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI 566

:** *****

035375

Таблица 3

Полипептиды, экспрессированные в *P. pastoris*

НАБОР 1		Техн. паспорт станка										В-писта																												
Класс	Сигнал сигнали- ции с СК6251	Сигнал НТФР	Сопро- твление	Корректирующее со- отноше- ние (в от- ношении нормаль- ного) Е, Н	337				340				352				353				402				406				409				413				416			
					Е, I, K, V	I, K, R, T	O, F, V, Y	I, K, R, T	Е, K, M, V	F, I, N, S, T, Y	A, G, I, R, T, V	F, I, N, S, T, Y	H, I, L, N, R, S																											
239E11	1078944	1492	721,81	121,52	K	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
127H1	800024	6572	121,73	20,5	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
171E5	879704	15508	70,44	12,87	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
239D2	570242	9279	61,47	10,35	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
247B2	414984	5285	54,73	9,21	K	I	Y	T	V	I	F	S																												
253D4	395824	7546	52,45	8,83	K	T	F	T	M	F	I	N	R	S																										
252F5	421824	8621	48,93	8,24	V	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
220C9	1086064	22605	48,04	8,09	K	T	F	T	M	F	I	N	R	S																										
175D3	139624	2937	21,61	4,02	V	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
137C11	416504	9167	45,44	7,65	V	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
131B5	844344	20419	41,35	6,96	K	T	F	T	M	F	I	N	R	S																										
233F11	583024	14389	40,52	6,82	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
234C5	377864	9465	39,52	6,72	I	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
115A1	1176604	30388	38,73	6,52	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
185G7	505864	13503	36,10	6,28	K	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
275D4	327354	9030	36,25	6,10	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
244B8	273744	7757	35,29	5,94	I	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
252B8	284984	8252	34,54	5,81	K	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
213C11	667024	20624	32,34	5,44	V	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
174G3	491184	15320	32,06	5,40	K	T	Y	K	V	I	F	S																												
125D10	133904	4241	31,57	5,31	K	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
127A7	233064	498	21,08	5,23	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
304G11	110504	3588	30,8	5,13	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
162A11	364024	11939	30,49	5,13	V	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
271F10	315304	10348	30,47	5,13	I	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
218G11	958504	33710	28,43	4,79	I	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
251C8	269544	9834	27,88	4,71	K	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
165B46	105624	4024	27,59	4,64	K	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
134A6	436304	13656	26,28	4,42	E	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
214C11	317904	12120	26,23	4,42	E	I	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
182G8	399864	15262	26,2	4,41	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
113E7	986064	38018	25,41	4,28	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
230G9	854804	34093	25,07	4,22	K	K	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
419B94	16998	2448	24,68	4,15	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
162D7	418944	17036	24,51	4,13	I	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
272H2	263264	10844	24,28	4,09	K	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
191C8	309064	12753	24,23	4,08	I	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
123C10	237824	9843	24,16	4,07	K	I	Y	K	M	F	A	F	I																											
284B9	1663504	70812	23,49	3,95	K	T	Y	R	M	F	I	N	R	S																										
134A3	531784	23414	22,71	3,92	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
189F4	287384	12888	22,75	3,91	K	K	F	T	M	F	I	N	R	S																										
189B7	336344	15207	22,12	3,72	E	T	F	T	M	F	I	N	R	S																										
148D5	329144	14944	21,85	3,70	E	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
194C8	242304	11113	21,8	3,67	I	T	F	T	M	F	I	N	R	S																										
168A8	279144	13001	21,47	3,61	K	T	Y	K	M	F	V	F	I																											
162B3	279884	13159	21,25	3,58	V	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
204C5	832784	39330	21,17	3,56	V	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
216E5	334904	15873	21,15	3,55	V	T	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
129C2	199464	9486	21,03	3,54	V	R	Y	T	M	F	I	N	R	S																										
788E8	158704	7662	20,71	3,49	E	I	F	T	M	F	I	N	R	S																										
26464	180504	8751	20,63	3,46	K	I	Y	T	V	I	F	V	S																											
214C4	302264	14709	20,55	3,46	I	I	F	T	V	F	A	F	I																											
125A8	212224	10327	20,55	3,46	K	I	F	T	V	I	F	V	I																											
123G3	496784	26442	20,26	3,43	E	K	Y	K	M	F	S	F	I																											
167C6	354664	16937	20,4	3,43	E	K	Y	K	M	F	S	F	I																											
134H10	591704	29238	20,23	3,41	K	T	Y	T	V	I	T	F	I																											
187H10	299224	15289	19,57	3,29	K	T	Y	I	M	F	I	G	F																											
101D4	336584	17243	19,52	3,29	I	K	Y	I	M	F	I	S	N																											
195B6	206904	10650	19,43	3,27	K	K	Y	R	M	F	I	S	N																											
175C5	295844	15408	19,71	3,23	K	K	R	T	M	F	I	N	R	S																										
112F3	449824	24169	18,83	3,13	V	R	F	T	M	F	I	N	R	S																										
175A5	193104	10476	18,43	3,10	I	T	F	T	M	F	I	N	R	S																										
213B2	131704	7178	18,35	3,09	K	K	Y	T	M	T	V	F	I																											
307A10	114984	6348	18,11	3,05	I	K	F	T	M	Y	G	V	F																											
125C3	211944	12413	17,72	2,98	E	T	F	I	M	F	G	T	I																											
263B6	151384	8800	17,18	2,89	I	T	F	I	M	F	I	G	T																											
137F11	147064	7888	16,63	2,83	E	R	Y	R	M	F	F	I																												
134D3	393504	18129	16,74	2,82	E	R	F	I	M	Y	T	F	S																											
131D5	344504	20857	16,52	2,78	V	T	Y	I																																

Экспрессию и связывание с CR6261 определяли согласно описанному и рассчитывали соотношение сигналов связывания и экспрессии.

Таблица 4

Полипептиды, экспрессируемые в *P. pastoris*

Набор 2	Зона белковых сигналов																						В-сигнал			
	337	340	352	353	402	406	408	413	416																	
Клон	Сигнал связывания с CR6261	Сигнал HTRF	Соотношение	Кратность увеличения соотношения по сравнению с исходной SEQ ID NO: 6	A.E.L.K.T.V	F.I.N.S.T.Y	A.D.F.L.N.S.T.V.Y	E.G.I.K.R.V	M.R.T	F.H.L.Y	F.L.S.T	E.K.M.V	I.L.R.S													
86B4	1077144	13862	77,7	13,08	K	N	Y	K	M	F	I	M	I													
7A7	987824	13452	73,43	12,36	T	N	Y	V	M	Y	I	F	E	R												
55G7	616184	8767	70,28	11,83	K	N	Y	V	M	Y	I	M	L													
71H2	1109984	16750	66,27	11,16	K	N	F	K	M	L	I	V	S													
8EV3	900604	14448	62,35	10,50	K	N	Y	K	M	L	I	V	R													
71A4	1064144	17597	60,47	10,18	T	N	Y	V	M	Y	F	E	S													
51G3	460304	7773	59,22	9,97	T	I	F	V	M	L	F	E	S													
84B8	582144	10091	57,69	9,71	K	N	Y	I	M	F	F	M	S													
79C2	364184	7116	51,18	8,62	T	N	Y	R	M	F	T	V	S													
69G8	481344	9479	50,78	8,55	I	N	F	R	M	L	I	V	L													
79D5	702584	13981	50,25	8,46	A	N	F	K	M	L	F	V	L													
54N4	291744	5857	49,81	8,39	K	I	Y	K	M	L	I	E	L													
11H6	427384	9146	46,73	7,87	K	N	Y	E	M	F	T	E	S													
90A9	413664	9025	45,84	7,72	K	S	Y	V	M	Y	T	V	S													
75G5	1011384	26695	37,89	6,38	E	S	Y	V	M	L	F	E	R													
8A10	360104	9630	37,39	6,29	K	N	Y	V	M	L	I	V	R													
72D4	329944	8881	37,15	6,25	V	N	F	R	M	F	S	M	S													
74N9	1283144	35494	36,15	6,09	K	N	F	K	M	Y	F	M	S													
88C5	471424	13355	35,3	5,94	K	N	V	R	M	L	I	V	R													
61A9	383064	10864	35,20	5,94	T	N	F	R	M	F	I	E	L													
86H0	497344	13340	34,38	5,77	K	N	F	G	M	F	T	V	S													
71D3	1573024	46711	33,68	5,67	I	S	Y	V	M	F	I	V	L													
9C6	270984	8235	32,91	5,54	K	T	Y	V	M	Y	T	K	I													
81F11	317824	9964	31,9	5,37	K	I	F	V	M	F	F	V	S													
84E10	255064	7996	31,9	5,37	I	N	F	R	M	F	S	V	S													
71C4	1350144	44339	30,45	5,13	K	N	F	G	M	F	I	V	S													
84D3	84424	2920	28,91	4,87	E	N	F	K	M	L	I	E	S													
96H8	205904	7224	28,5	4,80	K	Y	Y	K	M	F	I	M	S													
85A7	235704	8416	28,01	4,72	K	N	Y	E	M	L	F	V	R													
50G10	264144	9470	27,89	4,70	T	N	F	E	M	F	F	V	S													
6A1	299824	10912	27,48	4,63	A	N	F	R	M	F	F	M	S													
91C4	1157424	44837	25,81	4,35	K	N	F	G	M	L	I	M	R													
2C4	258264	10139	25,47	4,29	I	N	F	V	M	F	I	V	L													
63C3	188184	7625	24,68	4,15	E	T	Y	K	M	F	I	V	L													
85D	196024	8115	24,16	4,07	K	N	V	G	M	F	F	V	I													
67C10	306104	12907	23,72	3,99	E	T	F	V	M	F	F	M	L													
10F9	165984	7113	23,34	3,93	I	I	Y	V	M	Y	F	E	R													
4C1	385504	16548	23,3	3,92	K	N	S	V	M	F	I	E	I													
86G3	183944	7995	23,01	3,87	T	S	Y	V	M	F	T	V	L													
51G10	215264	9727	22,13	3,73	A	N	Y	R	M	F	I	K	S													
58A5	90744	4142	21,91	3,69	V	T	F	R	M	L	I	M	S													
56F8	235344	10823	21,74	3,66	I	N	F	E	M	F	T	E	L													
67C11	209184	9856	21,22	3,57	K	Y	Y	I	M	F	F	E	I													
91C8	333584	16012	20,83	3,51	K	N	F	G	M	L	I	K	S													
48B11	302864	14946	20,26	3,41	I	N	F	G	M	L	I	E	S													
78F11	84104	4155	20,24	3,41	I	I	F	R	M	Y	F	E	I													
76A10	136984	6841	20,02	3,37	I	Y	F	V	M	Y	F	F	E	I												
55H2	58104	2984	19,47	3,28	I	I	Y	V	M	F	F	V	S													
74D7	358784	18453	19,44	3,27	K	N	A	G	M	F	I	M	S													
11B4	156464	8679	19,18	3,23	T	S	F	V	M	Y	T	V	S													
56F4	185984	9740	19,09	3,21	T	T	F	E	M	F	S	M	S													
71E7	207704	10588	18,97	3,19	K	N	S	R	M	Y	I	E	S													
48B10	102904	5480	18,78	3,16	I	F	F	K	M	L	F	M	S													
48D11	120584	6807	17,71	2,98	E	Y	Y	V	M	F	T	V	S													
35H3	106224	6092	17,44	2,94	V	S	F	V	M	L	S	M	R													
53G10	107784	6188	17,42	2,93	T	N	F	V	M	L	T	V	S													
86F1	158624	9145	17,35	2,92	I	I	F	V	M	Y	I	V	I													
9C10	114144	6595	17,31	2,91	I	I	Y	V	M	H	S	V	S													
61I2	372504	22044	16,9	2,85	E	N	F	I	M	L	F	V	L													
2D9	316024	19245	16,42	2,76	K	N	N	I	M	Y	F	E	L													
27B10	187344	11465	16,34	2,75	K	N	N	V	M	L	F	E	S													
79F8	185264	11801	15,7	2,64	I	N	V	I	M	F	T	E	S													
11F4	150824	9996	16,09	2,64	I	Y	F	V	M	Y	F	V	L													
60A2	92564	6166	15,03	2,53	E	N	Y	V	M	F	S	E	L													
58C8	277144	18603	14,9	2,51	A	S	Y	I	M	L	S	E	L													
12C6	289184	20023	14,44	2,43	I	N	S	V	M	L	I	E	L													
89F11	84824	5908	14,36	2,42	T	I	Y	I	M	L	S	V	S													
96G5	108264	7589	14,27	2,40	V	N	F	I	M	Y	F	M	S													
29C2	177904	12921	13,77	2,32	K	N	F	G	M	Y	F	M	R													
56D2	145624	10658	13,66	2,30	E	T	F	I	M	F	F	K	S													
66C8	184544	13591	13,58	2,29	K	N	V	I	M	L	F	V	L													
69D2	445704	34266	13,01	2,19	V	F	F	V	M	Y	T	E	S													
75E9	134504	10422	12,91	2,17	I	I	F	G	M	F	S	E	I													
97G10	253104	20061	12,62	2,12	E	S	F	I	M	F	F	E	I													
36E4	196104	15917	12,32	2,07	I	N	N	K	M	F	F	V	L													
7D9	77824	6320	12,31	2,07	K	N	F	V	M	F	F	M	L													
1F2	148544	12244	12,13	2,04	K	N	Y	V	M	F	F	M	I													
76D10	113664	9729	11,68	1,97	I	N	A	K	M	L	T	E	S													
36A2	171144	14761	11,59	1,95	T	N	Y	K	M	H	F	M	R													
86G2	69704	6069	11,49	1,93	E	N	F	V	M	L	I	E	R													
63D3	145784	13100	11,13	1,87	K	N	I	G	M	F	T	E	L													
96A7	83304	7575	11	1,85	V	I	F	V	M	F	S	V	S													
36D6	71304	6569	10,85	1,83	I	N	A	G	M	F	T	E	I													
91F10	14784	1394	10,6	1,78	T	N	Y	G	M	F	I	E	R													
80F10	90864	8909	10,55	1,78	I	S	S	V	V	M	L	I	E	S												
75H8	103304	10074	10,25	1,73	A	N	N	V	M	F	F	M	S													
57B8	58384	5800	10,07	1,70	K	I	Y	I	M	F	F	V	I													
8D7	73424	7324	10,03	1,69	K	N	F	V	M	L	F	E	L													
58A11	53264	5363	9,93	1,67	V	T	Y	I	M	F	T	V	S													
7B6	60384	6137	9,84	1,66	K	I	S	E	M	F	I	M	S													
87H5	78104	7934	9,77	1,64	E	I	F	I	M	F	T	E	R													
70F6	418604	43334	9,66	1,63	K	N	F	G	I	M	L	T	E	R												
26F4	79744	8268	9,64	1,62	E	E	I	Y	G	M	L	S	V	I												
78G2	56704	6055	9,36	1,58	V	I	Y	G	M	L	F	E	I													
SEQ ID NO: 6 AV + 250					9,28																					
SEQ ID NO: 238077					5,94																					
40100					1,00																					

Таблица 5

Полипептиды, экспрессированные в HEK293F

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

Экспрессию и связывание с CR6261 определяли согласно описанному и рассчитывали соотношения сигналов связывания и экспрессии. Мутации, включенные в каждый клон, указаны в табл. 4 и 5.

Таблица 6

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

Положение	Аминокислота	H1	H3	H5	H7
337	V	67	99	19	100
	I	32	1	2	
	T	0,8		3	
	S			73	
	Y			0,1	
	N			0,5	
	A			2	
	G			0,1	
340	I	99		21	98
	V	0,43			
	T	0,03	0,5		
	K		97		
	R		2	47	
	G			29	
	E			0,3	
	S				2
352	F	100	100	100	100
353	I	99,9	100	100	100
	L	0,1			
402	M	100		100	
	T		99,8		100
	S		0,02		

Таблица 7

Очистка и сила связывания с mAb полипептидов

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

Таблица 8

Значения молекулярного веса, определенные с помощью SEC-MALS, для полипептидов по настоящему изобретению и их комплексов с Fab-фрагментами CR6261 и CR9114

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

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

Таблица 9

Разрабатываемые и тестируемые дисульфидные мостики

Кластер	Положения, в которые введены цистеиновые остатки
14	423 и 424
15	430 и 431
16	404 и 433
17	405 и 429
18	411 и 419
19	38 и 390
21	39 и 393
22	36 и 394
23	342 и 460
24	344 и 467
25	344 и 464

Таблица 10

Значения молекулярного веса, определенные в экспериментах по SEC-MALS

Название конструкции	Тример	Mw (кДа)		***K _d ^{app} (нМ)	
		Комплекс тримерного белка с		Комплекс белка с	
		CRF9114	CRF6261	CR9114	CR6261
s127H1-t2-cl18long	108 (120)	241 (246)	216 (255)	0,5	0,5

*** K_d^{app} рассчитывали на основании измерений с помощью Octet в стационарном состоянии (см. фиг. 9).

Теоретически ожидаемые значения для комплексов тримерного FL или s127H1-t2-cl18 и тримерного FL или s127H1-t2-cl18 с Fab-фрагментами (3 на тример) приведены в скобках.

Таблица 11

Разработка межпротомерных дисульфидных мостиков для полипептидов стеблевого домена, полученных из НА штаммов вируса гриппа из группы 2

Кластер	Положения, в которые введены цистеиновые остатки	Примечания
14	425 и 426	Нумерация относится к последовательности полноразмерного НА H3N2 A/Hong Kong/1/1968 (SEQ ID NO: 237)
15	432 и 433	
17	407 и 431	
18	413 и 421	
30	410 и 428	
31	411 и 428	

Таблица 12

Сводные данные о доле выживших (в %), о которых сообщается в примерах 17-21

Подтип	Штамм для контрольного заражения	SEQ ID NO: 186	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 186*	№ примера
H5N1	A/HK/156/97	100				17 (переливание сыворотки крови)
H1N1	A/Bris/59/07		100	100	100	18
H1N1	A/NL/602/09		60	100	70	19
H1N1	A/PR/8/34		100	100	100	21
H5N1	A/HK/156/97		100	100	100	20

* Экспрессируется в клетках насекомых Sf9.

Значения % выживаемости приведены в день 21 после контрольного заражения (конец периода последующего наблюдения) и во всех случаях значительно отличаются от таковых для группы отрицательного контроля, получавшей PBS.

Таблица 13

Выход белка и значения EC50 очищенного материала в сэндвич-ELISA

Конструкция	Выход (мг/л надосадочной жидкости культуры)	Антитело	EC50 (мкг/мл)
s127H1-t2-cl18long SEQ ID NO: 181	~ 11,1	CR9114	0,026
		CR6261	0,139
Tex_s127H1-t2-cl18 SEQ ID NO: 208	~ 13,7	CR9114	0,045
		CR6261	0,369
NY_s127H1-t2-cl18 SEQ ID NO: 210	~ 2,7	CR9114	0,070
		CR6261	0,455

Таблица 14

Получение характеристик полипептидов по настоящему изобретению
с дополнительным С-концевым тримеризационным доменом

Конструкция, SEQ ID NO:	Экспрессия по AlphaLISA (единицы)	Экспрессия (интенсивность полосы тримера в вестерн- блоттинге)	ELISA для мультимеров (Log ₁₀ EC50 разведения надосалочной жидкости)	Связывание с CR9114 по AlphaLISA (единицы)	Связывание с CR6261 по AlphaLISA (единицы)
186		Очень хорошая	4,43	2,71E+05	1,55E+05
255	1,38E+06	Очень хорошая	4,81	8,79E+05	5,72E+05
256	1,33E+06	Очень хорошая	4,72	7,14E+05	4,75E+05
257	1,67E+06	Очень хорошая	4,86	8,61E+05	5,87E+05
258	1,54E+06	Очень хорошая	4,82	8,42E+05	6,25E+05

Ссылки.

- Alberini et al. (2009), Vaccine 27: 5998-6003.
- Bommakanti et al. (2010), PNAS 107(31): 13701-13706.
- Bommakanti et al. (2012), J Virol 86: 13434.
- Cheng et al. (2014), J. Immunol. Methods 1-13.
(doi:10.1016/j.jim.2014.07.010)
- Coffman et al. (2010), Immunity 33: 492.
- Devereux et al. (1984), Nucl. Acids Res. 12: 387.
- DiLillo et al. (2014), Nat Med 20, 143.
- Dopheide TA, Ward CW. (1981) J Gen Virol. 367-370.
- Ekiert et al. (2009), Science 324:246.
- Ekiert et al. (2011), Science 333: 844.
- Ferguson et al. (2003), Nature 422: 428-443.
- Lorieau et al. 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 11341.
- Lu et al. (2013),
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1308701110.
- Mallajosyula et al. (2014).,
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1402766111.
- Parekh et al. (2012), mAbs 4: 310.
- Safronetz et al. (2011) J Virol. 85:1214.
- Schnueriger et al. (2011), Molecular Immunology 48: 1512.
- Steel et al. (2010), mBio 1(1): 1-9.
- Steven et al. (2004) Science 303: 1866.
- Steven et al. (2006) Science 312: 404.
- Temperton et al. (2007) Viruses 1: 105-12.
- Throsby et al. (2008), Plos One 12(3): 1-15.
- Wilson et al (1981) Nature 289: 366.

Последовательности.

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

MKVLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 ENSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP 100
 NPENGTCYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA 150
 SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPPN 200
 IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYWTLL 250
 EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRGFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG 300
 AINSSLPFQV VHPVTIGECF KYVRSALRM VTGLRN**I**PS**I** QSRGLFGAIA 350
G**F****I**EGGW**T**GM VDGWYGYHHQ NEQGSYAAD QKSTQNAING ITNKNVSVIE 400
K**M****N**TQ**F**T**A**V**G** **K****E****F****N****K****L**E**R**RM ENLNKKVDDG FIDIWYNAE LLVLENER 450
 LDFHDSNVKN LYEKVSQLK NNAKEIGNGC FEFYHKCNDE CMESVKNGTY 500
 DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLVSLGAIS 550
 FWMCSNGLQ CRICI 565

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

MKVLLVLLC TFTATYA DTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 ENGGGGKYVC SAKLRMTGL RN**I**PS**I**QS**Q** LFGAIA**G****F****I**E GGWTGMVDGW 100
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIE**K****M****N**T Q**S**T**A**T**G****K****E****G****N** 150
K**S****E**RM**K****Q****I**E**D** **K****I****E****E****I****E****S****K****Q****I** WCYNALLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200
 VKSQLKNAK EIGNGCFEFY HKCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250
 KIDGVKLESM GYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAISFWMC SNGSLQCRIC 300
 I 301

SEQ ID NO: 3: foldon

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO: 4: FLAG-thrombin-foldon-HIS

SGRDYKDDDDKLVPGRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHH

SEQ ID NO: 5:

MKQIEDKIEEIESKQ

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

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNIPS
 IQS**Q**GLFGAIA**G****F****I**EGGW**T**GMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKNVSVIEKM
 NTQSTATGKEGNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNALLVLENERLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVSGRDYKDD
 DKLVPGRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHH

SEQ ID NO: 7: остаток консенсусной последовательности H1
402-418 (нумерация согласно SEQ ID NO:1)

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

>БЕЛОК VH ЦЕПИ SC09-114 (SEQ ID NO: 11)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKSSGGTSNNYAISWVRQAPGQGLDWMGGISPIFGST
AYAQKFQGRVTISADIFSNAYMELNSLTSEDVAVYFCARHGNYYYSGMDVWQGQTTVTVSS

>БЕЛОК VL ЦЕПИ SC09-114 (SEQ ID NO: 12)

SYVLTQPPAVSGTPGQRTISCSGSDSNIGRRSVNWWYQQFPGTAPKLLIYSNDQRPSV
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAEYYCAAWDDSLKGAVFGGGTQLTVL

>БЕЛОК VH ЦЕПИ CR6261 (SEQ ID NO: 9)

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

>БЕЛОК VL ЦЕПИ CR6261 (SEQ ID NO: 10)

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

>БЕЛОК VH ЦЕПИ SC08-057 (SEQ ID NO: 13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDSVIFMSWVRQAPGKGLECVSIIYIDDSTY
YADSVKGRFTISRHNMGTVFLEMNSLRPDDTAVYYCATESGDFGDTGPYHYAMDV

>БЕЛОК VL ЦЕПИ SC08-057 (SEQ ID NO: 14)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSGDIGGYNAVSWYQHHPGKAPKLMIEVTSRPS
GVSDRFSASRSGDTASLTVSGLQAEDEAHYYCCSFADSNILI

>БЕЛОК VH ЦЕПИ SC08-020 (SEQ ID NO: 17)

QVQLQSGAEVKTPGASVKVCKASGYTFTRFGVSWIRQAPGQGLEWIGWISAYNGDT
YYAQKFQARVTMTTDTSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDN

>БЕЛОК VL ЦЕПИ SC08-020 (SEQ ID NO: 18)

EIVXTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATG
IPDRISGSGSGTDFTLTISRLEPADFAVYYCQQYGTSPRT

SEQ ID NO: 51: H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2

MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 ENGGGGKYVC SAKLRMTGRL RNIPSIQSQG LFGAIAGFIE GGWTGMVDGW 100
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEKMNT QSTATGKEGN 150
 KSERRMKQIE DKIEEIESKI WCYNALLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200
 VKSQLKNNAK EIGNGCFEFY HKCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250
 KIDGVKLESM GYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAISFWMC SNGSLQCRIC 300
 I 301

SEQ ID NO: 52: H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t3

MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 ENGGGGKYVC SAKLRMTGRL RNIPSIQSQG LFGAIAGFIE GGWTGMVDGW 100
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEKMNT QSTATGKEGN 150
 KSERRMKQIEDK IEEIESKQKI WCYNALLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200
 VKSQLKNNAK EIGNGCFEFY HKCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250
 KIDGVKLESM GYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAISFWMC SNGSLQCRIC 300
 I 301

SEQ ID NO: 55: 127H1

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGRLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNALLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 56: 86B4

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGRLRNKPSNQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNALLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 57: 74H9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGRLRNKPSNQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNALLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 58: 6E12

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
VCSAKLRMTGLRNEPSNQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
NAINGITNKVNSVIEKMNTQLTAFGKEVKNLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 59: 55G7

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAK
LRMTGLRKNPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAING
ITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENERTLDF
HDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 60: 115A1

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
VCSAKLRMTGLRKNPSKQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
NAINGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
NREKIDG VKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 61: 71H2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
VCSAKLRMTGLRKNPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
NAINGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVKNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 62: 181H9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
VCSAKLRMTGLRNVPSKQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 63: 220C9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
VCSAKLRMTGLRKNPSTQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 64: 113E7

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGGKY
VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 65: s74H9

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
NQSQGLFGAIAAGFTGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
NTQYTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
HHHHHH

SEQ ID NO: 66: s127H1

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
KQSQGLFGAIAAGFTGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
NTQYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
HHHHHH

SEQ ID NO: 67: s86B4

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
NQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
NTQFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
HHHHHH

SEQ ID NO: 68: s55G7

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
NQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
NTQYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
HHHHHH

SEQ ID NO: 69: s6E12

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNEPS
NQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
NTQLTAFGKEVNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
HHHHHH

SEQ ID NO: 70: s115A1

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 71: s71H2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAIGKEVNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 76: s181H9

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNVPS
 KQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAVGKEFNKNERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 77: s220C9

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 TQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 78: s113E7

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 72: s74H9-long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 73: s127H1-long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 74: s86B4-long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 75: s55G7-long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 144: s6E12-long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNEPS
 NQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAFGKEVNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 79: s115A1ong

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 80: s71H2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAIGKEVNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 81: 127H1-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 82: 86B4-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 83: 74H9-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAFGKEMNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 84: 6E12-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNEPSNQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQLTAFGKEVNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 85: 55G7-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAK
 LRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAING
 ITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNERTLDF
 HDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 86: 115A1-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 87: 71H2-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 88: 181H9-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNVPKPSQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 89: 220C9-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 90: 113E7-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKPSQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 91: s127H1-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 92: s86B4-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAIGKEMNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 93: s74H9-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAFGKEMNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 94: s6E12-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNEPS
 NQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAFGKEVKNLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 95: s55G7-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPSNQSQG
 LFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYT
 AIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 NNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 96: s115A1-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQITAVGKEYNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 97: s71H2-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAIGKEVKNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 98: s181H9-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNVPS
 KQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAVGKEFNKNERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 99: s220C9-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 TQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTATGKEYNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 100: s113E7-t2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTATGKEINKHERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 101: s127H1-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 102: s86B4-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAIGKEMNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 103: s74H9-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAFGKEMNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 104: s6E12-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNEPS
 NQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAFGKEVNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 105: s55G7-t2long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPSNQSQG
 LFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYT
 AIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 NNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 106: s115A1-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQITAVGKEYNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 107: s71H2-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAVGKEVKNKERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 108: s181H9-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNVPS
 KQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAVGKEFNKNERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 109: s220C9-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 TQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTATGKEYNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 110: s113E7-t2long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTATGKEINKHERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 111: 127H1-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 112: 86B4-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 113: 74H9-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAFGKEMNKSRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 114: 6E12-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNEPSNQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQLTAFGKEVNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 115: 55G7-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAK
 LRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAING
 ITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLNERTLDF
 HDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKI
 DGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 116: 115A1-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 117: 71H2-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVNKSRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 118: 181H9-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNVPSKQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 119: 220C9-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 120: 113E7-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 121: s127H1-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGKEYNKSQKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 122: s86B4-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAIGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 123: s74H9-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAFGKEMNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 124: s6E12-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPS
 NQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAFGKEVNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 125: s55G7-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQG
 LFAGIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYT
 AIGKEMNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 NNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHH
 H

SEQ ID NO: 126: s115A1-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQITAVGKEYNKIR MKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 127: s71H2-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAIGKEVNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 128: s181H9-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNVPS
 KQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAVGKEFNKN RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 129: s220C9-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 TQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTATGKEYNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 130: s113E7-t3

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTATGKEINKHRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 131: s127H1-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGKEYNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 132: s86B4-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAIGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 133: s74H9-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAFGKEMNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 134: s6E12-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNEPS
 NQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAFGKEVNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 135: s55G7-t3long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPSNQSQG
 LFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYT
 AIGKEMNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
 NNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 136: s115A1-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQITAVGKEYNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKLNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 137: s71H2-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 NQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQLTAVGKEVKNRMRKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKLNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 138: s181H9-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAVGKEFNKMRKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKLNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 139: s220C9-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 TQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTATGKEYNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKLNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 140: s113E7-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTATGKEINKHRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQKLNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 141: s181H9long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNVPS
 KQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTAVGKEFNKNERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 142: s220C9long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 TQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 143: s113E7long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 IEG

SEQ ID NO: 149: 55G7-t2-c114

MKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQCCDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCNGLQCR
 ICI

SEQ ID NO: 150: 55G7-t2-c115

MKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIECCSKIWCYNAELL
 VL

LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 151: 55G7-t2-cl16
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNCQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESCIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 152: 55G7-t2-cl17
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTCYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIECIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 153: 55G7-t2-cl18
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEMNKLERCМКQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK

YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
ICI
SEQ ID NO: 154: 55G7-t2-cl19
MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLCKNVTVTHSVNLENGGGGKY
VC
SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
ST
QNAINCITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTIDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
ICI
SEQ ID NO: 155: 55G7-t2-cl21
MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLECNVTVTHSVNLENGGGGKY
VC
SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
ST
QNAINGITCKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTIDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
ICI
SEQ ID NO: 156: 55G7-t2-cl22
MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTCLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
VC
SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
ST
QNAINGITNCVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTIDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
ICI
SEQ ID NO: 157: 55G7-t2-cl23

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMTGLRNKPSNQCQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKCLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 158: 55G7-t2-cl24
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQCCLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKCQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 159: 55G7-t2-cl25
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQCCLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYECVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 160: 127H1-t2-cl14
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC

SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQCCDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTIDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 161: 127H1-t2-cl15
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEECCSKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTIDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 162: 127H1-t2-cl16
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNCQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESCIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTIDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 163: 127H1-t2-cl17
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST

QNAINGITNKVNSVIEKMNTCYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIECIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 164: 127H1-t2-cl18
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 165: 127H1-t2-cl19
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLCKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINCITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 166: 127H1-t2-cl21
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLECNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITCKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL

LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 167: 127H1-t2-cl22
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTCLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNCVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 168: 127H1-t2-cl23
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQCQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKCLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
 ICI
 SEQ ID NO: 169: 127H1-t2-cl24
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
 VC
 SAKLRMVTGLRNKPSKQSQCLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKCQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDY
 PK

YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
ICI
SEQ ID NO: 170: 127H1-t2-cl25
MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKY
VC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQCLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYECVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCR
ICI
SEQ ID NO: 171: s55G7-t2-cl14long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQCCDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 172: s55G7-t2-cl15long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEECCSKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 173: s55G7-t2-cl16long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST

QNAINGITNKVNSVIEKMNCQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESCIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 174: s55G7-t2-cl17long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTCYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIECIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 175: s55G7-t2-cl18long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEMNKLERCCKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 176: s55G7-t2-cl19long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLCNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST
 QNAINCITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 177: s55G7-t2-cl21long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLECNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
 SAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQK
 ST

QNAINGITCKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 178: s55G7-t2-cl22long
 DTICIGYHANNSTDVDTCLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNCVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 179: s55G7-t2-cl23long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSNQCQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKCLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 180: s55G7-t2-cl24long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQCCLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKCQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 181: s55G7-t2-cl25long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSNQSQCCLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST

QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYECSVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 182: s127H1-t2-cl14long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQCCDKIEEIESKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 183: s127H1-t2-cl15long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEECCSKIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 184: s127H1-t2-cl16long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST
 QNAINGITNKVNSVIEKMNCQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESCIWCYNAELL
 VL
 LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
 PK
 YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
 SEQ ID NO: 185: s127H1-t2-cl17long
 DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVC
 SAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
 ST

QNAINGITNKVNSVIEKMNTCYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIECIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 186: s127H1-t2-cl18long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 187: s127H1-t2-cl19long
DTICIGYHANNSTDVDTVLCNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINCITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 188: s127H1-t2-cl21long
DTICIGYHANNSTDVDTVLECNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITCKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFEYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 189: s127H1-t2-cl22long
DTICIGYHANNSTDVDTCLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST

QNAINGITNCVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 190: s127H1-t2-cl23long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQCQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKCLYKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 191: s127H1-t2-cl24long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQCLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYEKVKCQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 192: s127H1-t2-cl24long
DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGGKYVC
SAKLRMVTGLRNKPSKQSQCLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQK
ST
QNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELL
VL
LENERTLDFHDSNVKNLYECVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDY
PK
YSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG
SEQ ID NO: 193: CMKQIEDKIEEIESK
SEQ ID NO: 194: RMCQIEDKIEEIESKQK
SEQ ID NO: 195: smH1 Cali3964-55G7

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLEDGGGGKY
VCSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQ
NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNHLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
NREEIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 196: smH1 Cali3964-86B4

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLEDGGGGKY
VCSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQ
NAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNHLIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
NREEIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 197: smH1 Cali3964-127H1

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLEDGGGGKY
VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQ
NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNHSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLLENE
RTLDDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
NREEIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 198: _smH1 Cali3964-55G7-t2

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLEDGGGGKY
VCSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQ
NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNHLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
RTLDDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
NREEIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 199: _smH1 Cali3964-86B4-t2

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLEDGGGGKY
VCSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQ
NAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNHLIERMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
RTLDDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
NREEIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 200: smH1 Cali3964-127H1-t2

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLEDGGGGKY
VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQ
NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNHSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
RTLDDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
NREEIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 201: mH1 Cali3964-127H1-t2

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKY
 VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQ
 NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNHSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
 NREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 202: mH1 Cali3964-127H1-t2-cl18

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKY
 VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQ
 NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
 NREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 203: smH1 Cali3964-127H1-t2-cl18long

DTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKV
 RSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQ
 IEG

SEQ ID NO: 204: FL HA H1N1 A/AA_Marton/43

MKARLLVLLC ALAATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 050
 EDSHNGKLCR LKGIAPLQLG KCNIAGWILG NPECESLLSE RSWSYIVETP 100
 NSENGTCYPG DFIDYEELRE QLSSVSSFER FEIFSKESSW PKHNTTRGVT 150
 AACSHAGKSS FYRNLLWLTE KDGSYPNLNN SYVNKKGKEV LVLWGVHHPS 200
 NIKDQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE IAERPKEVRGQ AGRMNYWTL 250
 LKPGDTIMFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH ECDTKCQTPQ 300
 GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI 350
 AGFIEGGWTG MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI 400
 EKMNTQFTAV GKEFNNLEKR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER 450
 TLDYHDSNVK NLYEKVKNL RNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT 500
 YDYPKYSEES KLNREKIDG V KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLVSLGAI

550

SFWMCSNGSL QCRICI 565

SEQ ID NO: 205: FL HA H1N1 A/Texas/UR06-0526/07

MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 050
 EDSHNGKLCL LKGTAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK EWSYIVETP 100
 NPENGTCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA 150
 SCSHNGKSSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPPN 200

IGDQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL 250
 EPGDTIIFEA NGNLIAPRFA FALSRRGFGSG IITSNAPMGE CDAKCQTPQG 300
 AINSSLPFQN VHPVTIGEC KYVRS AKLRM VTGLRNIPSI QSRGLFGAIA 350
 GFIEGGWTGM VDGWYGYHHQ NEQSGGYAAD QKSTQNAING ITNKVNSVIE 400
 KMNTQFTAVG KEFNKLERRM ENLNKKVDDG FLDIWTYNAE LLVLLENERT 450
 LDFHDSNVKN LYEKVKVQLK NNAKEIGNGC FEFYHKCNDE CMESVKNGTY 500
 DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLISLGAIS 550
 FWMCSNGSLQ CRICI 565

SEQ ID NO: 206: H1N1 A/New York/629/95

MKVKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 050
 EDSHNGKLCR LKGTAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP 100
 NPENGTCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT 150
 ASCSHNGKSS FYKNLLWLTE KNGLYPNLSK SYVNNKEKEV LVLWGVHHP 200
 NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE IAKRPKVRDQ EGRINYYWTL 250
 LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRRGFGS GIITSNASMS ECDAKCQTPQ 300
 GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI 350
 AGFIEGGWTG MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAID GITNKVNSVI 400
 EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER 450
 TLDHFHDSNVK NLYEKVKVQL KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT 500
 YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI 550
 SFWMCSNGSL QCRICI 566

SEQ ID NO: 207: H1 mini Texas 127H1_t2+c118

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKVQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLISLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 208: #5123_sH1 mini Texas 127H1_t2+c118

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 I

SEQ ID NO: 209: H1 mini NY 127H1_t2+c118

MKAKLLVLLCAFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDGGGGKY
 VCSTKLRLMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQ

NAIDGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKTQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQI LAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 210: #5124_sH1 mini NY 127H1_t2+c118

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KTQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 I

SEQ ID NO: 211: H1 mini Cal 127H1_t2+c118

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKY
 VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQ
 NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNHSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
 NREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 212: sH1 mini Cal 127H1_t2+c118

DTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRLATGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGCEYNHSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDYHDSNVKNLYEKV
 RSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQ
 I

SEQ ID NO: 213: H1 mini Mart 127H1_t2+c118+loop

MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKY
 VCSTKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKNQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 214: #5126 sH1 mini Mart 127H1_t2+c118+loop

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKYVCSTKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLLENERTLDFHDSNVKNLYEKV
 KNQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ
 I

SEQ ID NO: 215: H1 mini Mart 127H1_t2+c118

MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDGGGGKY
 VCSTKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQ

NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNNSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKNQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 216: sH1 mini Mart 127H1_t2+c118

MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDGGGGKY
 VCSTKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNNSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKNQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQ

SEQ ID NO: 217: FL HA H2N2 A/Adachi/2/57

MAIIYLILLF TAVRGDQICI GYHANNSTEK VDTILERNVT VTHAKDILEK 050
 THNGKLCKLN GIPPLELGDC SIAGWLLGNP ECDRLLSVPE WSYIMEKENP 100
 RNLGCYPGSF NDYEELKHLL SSVKHFEKVK ILPKDRWTQH TTTGGSQACA 150
 VSGNPSFFRN MVWLTKKGSD YPVAKGSYNN TSGEQMLIIW GVHHPIDETE 200
 QRTLYQNVGT YVSVGTSTLN KRSTPEIATR PKVNLGSRM EFSWTLLDMW 250
 DTINFESTGN LIAPEYGFKI SKRGSSGIMK TEGTLENCET KCQTPLGAIN 300
 TTLPFHNVHP LTIGECPKYV KSEKLVLATG LRNVPIESR GLFGAIAAGFI 350
 EGGWQGMVDG WYGYHHSNDQ GSGYAADKES TQKAFDGITN KVNSVIEKMN 400
 TQFEAVGKEF GNLERLENL NKKMEDGFLD VWTYNAELLV LMENERTLDF 450
 HDSNVKNLYD KVRMQLRDNV KELGNGCFEF YHKCDECMN SVKNGTYDYP 500
 KYEESKLNK NEIKGVKLSS MGVYQI LAIY ATVAGSLSLA IMMAGISFWM

550

CSNGSLQCRI CI 562

SEQ ID NO: 218: H2 mini Adachi 127H1_t2+c118

MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTTHAKDILENGGGGKYVC
 SEKLVLATGLRNKPQKESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKA
 FDGITNKVNSVIEKMNTQYEATGCEYGNLERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERT
 LDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEESKLNK
 NEIKGVKLSSMGVYQI LAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 219: H2 mini Adachi 127H1_t2+c118+loop

MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTTHAKDILENGGGGKYVC
 SEKLVLATGLRNKPQKESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKA
 FDGITNKVNSVIEKMNTQY**TAY**GCEY**NK**SERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERT
 LDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEESKLNK
 NEIKGVKLSSMGVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 220: #5119 sH2 mini Adachi 127H1 t2+c118

DQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTHAKDILENGGGGKYVCSEKLVLATGLRNKPQ
 KESQGLFGAIAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKM
 NTQYEATGCEYGNLERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
 RMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQ
 I

SEQ ID NO: 221: #5120 sh2 mini Adachi 127H1_t2+c118+loop

DQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTHAKDILENGGGGKYVCSEKLVLATGLRNKPQ
 KESQGLFGAIAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKM
 NTQY**TAY**GCEY**NK**SERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
 RMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQ
 I

SEQ ID NO: 222: FL HA H2N2 A/Singapore/1/1957

MAIIYLILLF TAVRGDQICI GYHANNSTEK VDTILERNVT VTHAKDILEK 050
 THNGKLCKLN GIPPLELGDC SIAGWLLGNP ECDRLLSVPE WSYIMEKENP 100
 RDGLCYPGSF NDYEELKHLL SSVKHFEKVK ILPKDRWTQH TTTGGSRACA 150
 VSGNPSFFRN MVWLTEKGSN YPVAKGSYNN TSGEQMLIIW GVHHPNDEKE 200
 QRTLYQNVGT YVSVGTSTLN KRSTPDIATR PKVNLGSRM EFSWTLLDMW 250
 DTINFESTGN LIAPEYGFKI SKRGSSGIMK TEGTLENCET KCQTPLGAIN 300
 TTLPFHNVHP LTIGECPKYV KSEKLVLATG LRNVPIESR GLFGAIAGFI 350
 EGGWQGMIDG WYGYHHSNDQ GSGYAADKES TQKAFDGITN KVNSVIEKMN 400
 TQFEAVGKEF SNLERRLENL NKKMEDGFLD VWTYNAELLV LMENERTLDF 450
 HDSNVKNLYD KVRMQLRDNV KELGNGCFEF YHKCDECMN SVKNGTYDYP 500
 KYEEESKLNREIKGVKLSS MGVIYILAIY ATVAGSLSLA IMMAGISFWM 550
 CSNGSLQCRI CI 562

SEQ ID NO: 223: H2 mini Sing 127H1_t2+c118

MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTHAKDILENGGGGKYVC
 SEKLVLATGLRNKPQKESQGLFGAIAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGYAADKESTQKA
 FDGITNKVNSVIEKMNTQYEAIGCEYSNLERCCKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERT
 LDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQ
 LAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 224: H2 mini Sing 127H1_t2+c118+loop

MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTHAKDILENGGGGKYVC
 SEKLVLATGLRNKPQKESQGLFGAIAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGYAADKESTQKA
 FDGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERT
 LDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQ
 LAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 225: #5121 sH2 mini Sing 127H1_t2+c118

DQICIGYHANNSTEKVDTILERNVTVTTHAKDILENGGGGKYVCSEKLVLATGLRNKPQ
KESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGGYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKM
NTQYEAIGCEYSNLERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
RMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLRNEIKGVKLSSMGVYQ
I

SEQ ID NO: 226: #5122 sH2 mini Sing 127H1_t2+c118+loop

DQICIGYHANNSTEKVDTILERNVTVTTHAKDILENGGGGKYVCSEKLVLATGLRNKPQ
KESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGGYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKM
NTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
RMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLRNEIKGVKLSSMGVYQ
I

SEQ ID NO: 227: FL HA H5N1 A/Vietnam/1203/2004

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKKHNGKLC
DLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDFINVPESYIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHL
SRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTN
QEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRISKVNGQSGRMEFFWT
ILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNI
HPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRERRRKTGRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHS
NEQSGGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLD
VWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVR
NGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSL
QCRICI

SEQ ID NO: 228: H5 mini VN/1203/2004

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKGGGGKYV
CSNRLVLATGLRNKPQKESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGGYAADKESTQK
AIDGVTNKVNSIIDKMNTQYEAIGCEYNNSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENER
TLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLK
REEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 229: sH5 mini VN/1203/2004

DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKGGGGKYVCSNRLVLATGLRNKPQ
KESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKM
NTQYEAIGCEYNNSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
RLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQ
I

SEQ ID NO: 230: H5 mini VN/1203/2004+loop

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKGGGGKYV
 CSNRLVLATGLRNKPQKESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQK
 AIDGVTNKVNSIIDKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENER
 TLDHFDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLK
 REEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 231: sH5 mini VN/1203/2004+loop

DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKGGGGKYVCSNRLVLATGLRNKPQ
 KESQGLFGAIAAGFTEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKM
 NTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
 RLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKRREEISGVKLESIGIYQ
 I

SEQ ID NO: 232: FL HA H9N2 A/Hong_Kong/69955/2008

METVSLITMLLVATVINADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHTEHNGM
 LCATNLGYPLILDCTIEGLIYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGLCYPGNVENLEELRS
 LFSSASSYQRIQIFPDTIWNVSYSGTSKACSDSFYRSMRWLTQKNNAYPIQDAQYTNREKNI
 LFMWGINHPPTDAQTNLYTRDTTTSVATEEINRTFKPLIGRPLVNGLQGRIDYYSVLKP
 GQTLRIRSNGLIAPWYGHILSGESHGRILKTDLKRGSCTVQCQTEKGGLNTTLPFQNVSKYA
 FGNCISKYVGVKSLKLAVGLRNVPSRSSRGLFGAIAAGFIEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMA
 ADDRSTQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINKIDDQIQDIWAYNAEL
 LVLLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGNSNAVEDGKGCFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRR
 YQEESKLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSLVIAMGFAAFLFWAMSGSCRCNICI

SEQ ID NO: 233: H9 mini HK/69955/2009

METVSLITMLLVATVINADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHGGGGKY
 VCVKSLKLAVGLRNKPSKSSQGLFGAIAAGFTEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADDRSTQ
 KAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDCEYSESERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ
 KTLDEHDANVNNLYNKVKRALGNSNAVEDGKGCFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRRYQEESKL
 ERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSLVIAMGFAAFLFWAMSGSCRCNICI

SEQ ID NO: 234: sH9 mini HK/69955/2009

DKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHGGGGKYVCVKSLLAVGLRNKPSK
 SSQGLFGAIAAGFTEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADDRSTQKAIDKITSKVNNIVDKMN
 KQYEIIDCEYSESERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVK
 RALGNSNAVEDGKGCFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRRYQEESKLERQKIEGVKLESEGTYKI

SEQ ID NO: 235: H9 mini HK/69955/2009+loop

METVSLITMLLVATVINADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHGGGGKY
 VCVKSLKLAVGLRNKPSKSSQGLFGAIAAGFTEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADDRSTQ
 KAIDKITSKVNNIVDKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENQ

KTLDDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAVEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRRYQEESKL
ERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSLVIAMGFAAFLFWAMSNNGSCRCNICI

SEQ ID NO: 236: sH9 mini HK/69955/2009+loop

DKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHGGGGKYVCVKSLLAVGLRNKPSK
SSQGLFGAIAGFTEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRSTQKAIDKITSKVNNIVDKMN
TQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLNQKTLDEHDANVNNLYNKVK
RALGSNAVEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRRYQEESKLERQKIEGVKLESEGTYKI

SEQ ID NO: 237: полноразмерный HA H3N2 A/Hong Kong/1/1968

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
VQSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDY
ASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGPSSGFFSRLNWLTKSGSTYPVLNVTM
PNNDNFDKLYIWGVHHPSTNOEOTSLYVOASGRVTVSTRSQOTIIPNIGSRPWVRLSSRIS
IYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISECITPNGSIPNDKPF
QNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFHRQN
SEG TGQAADLKSTQA AIDQINGKLN RVIEKTNEKFH QIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDL
WSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRN
GTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQRGNIRCN
NICI

SEQ ID NO: 238: #2999 H3 HK68 mini2-cl9+10+11+12-GCN4t

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFHRQNSEG TG
QAADLKSTQA AIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTEKESSEGEGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNA
ELLVALENQHTIDLTDSEMNKLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQRGNIRCNIC I

SEQ ID NO: 239: #3801 H3 HK mini2a-linker+cl9+10+11+12+GCN4T-CG7-1;

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFHRQNSEG TG
QAADLKSTQA AIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTEKESSEGEGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNA
ELLVALENQHTIDLTDSEMNKLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQRGNIRCNIC I

SEQ ID NO: 240: #2999-cl14

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFHRQNSEG TG
QAADLKSTQA AIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTEKESSEGEGRMKQCCDKIEEIESKLWCYNA

ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 241: #2999 c115

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTEKESSEGEGRMKQIEDKIEECCSKLWCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 242: #2999 c117

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNECSHQTEKESSEGEGRMKQIEDKIECIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 243: #2999 c118

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTECESSEGEGRMKQIEDKIEEIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 244: #2999 c130

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHCTEKESSEGEGRMKQIEDCIEEIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 245: #2999 c131

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQCEKESSEGEGRMKQIEDCIEEIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 246: #3801-c114

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTEKESSEGEGRMKQCCDKIEEIESKLCYNA

ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 247: #3801 c115

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEECCSKLWCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 248: #3801 c117

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNECSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIECIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 249: #3801 c118

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQTECESSNATGCMKQIEDKIEEIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 250: #3801 c130

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHCTEKESSNATGRMKQIEDCIEEIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 251: #3801 c131

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATEL
 VQSGGGGKYVCQNTLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTG
 QAADLKSTQAAIDQINGKLN RVREKTNEKSHQCEKESSNATGRMKQIEDCIEEIESKLCYNA
 ELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDH
 DVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD WILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

SEQ ID NO: 252: _FL HA H1N1 A/California/07/2009

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTD T VDTVLEKNVT VTHSVNLLDKHNGKL
 CKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQ
 LSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLKKGNSYPKLSKSYIN

DKGKEVLVLWGIHPSTSDQOSLYQNADAYVFGSSRYSKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYY
 WTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAINTSLPFQ
 NIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNE
 QGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIW
 TYNAELLVLENERLTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNG
 TYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQC
 RICI

SEQ ID NO: 253 H1 mini-HA 127H1-t2 S73L

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKLERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 254 sH1 mini-HA 127H1-t2longS73L (#5114)

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMTGLRNKPS
 KQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKM
 NTQYTAIGCEYNKLERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLTLDYHDSNVKNLYEKV
 KSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL NREKIDGVKLESMGVYQ
 I

SEQ ID NO: 255: UFV150124

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVSGRDYKDDDDKPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHH

SEQ ID NO: 256: UFV150125

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKY
 VCSAKLRMTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQ
 NAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENE
 RTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKL
 NREKIDGVKLESMGVYQIEGRAAADYKDDDDKPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG
 HHHHHH

SEQ ID NO: 257: UFV150134

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLEDGGGGKY
 VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQ
 NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENE
 RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
 NREEIDGVSGRDYKDDDDKPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHH

SEQ ID NO: 258: UFV150135

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTTHSVNLLEDGGGGKY
 VCSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQ
 NAIDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENE
 RTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKL
 NREEIDGVKLESTRIYQIEGRAAADYKDDDDKPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG
 HHHHHH

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультимерный полипептид стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа для индукции иммунного ответа против вируса гриппа, содержащий, по меньшей мере, первый и второй мономеры стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, при этом каждый из указанных первого и второго мономеров содержит: (а) домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, причем N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислотные остатки 1-52

HA1, ковалентно соединенный с помощью линкерной последовательности из менее 10 аминокислотных остатков с С-концевым стеблевым сегментом HA1, содержащим аминокислоты от 321 до С-концевой аминокислоты HA1; и

(b) где полипептид не содержит участок расщепления протеазами в месте сочленения между доменами HA1 и HA2; и

(c) где первый мономер соединен с указанным вторым мономером с помощью дисульфидного мостика между аминокислотой в положении 411 первого мономера и аминокислотой в положении 419 второго мономера, и

где в каждом мономере стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа область, содержащая аминокислотные остатки 402-418, содержит аминокислотную последовательность $X_1NTQX_2TAX_3GKEX_4N(H/K)X_5E$ (K/R) (SEQ ID NO: 8),

в которой X_1 представляет собой M, X_2 представляет собой Y, X_3 представляет собой I, X_4 представляет собой Y и X_5 представляет собой S; и

где в каждом мономере стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа аминокислотная последовательность CMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 193) введена в положения 419-433; и

где аминокислотный остаток в положении 337 представляет собой K, аминокислотный остаток в положении 340 представляет собой K, аминокислотный остаток в положении 352 представляет собой F и аминокислотный остаток в положении 353 представляет собой T;

где домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, происходящего из филогенетической группы 1, и причем нумерация положений аминокислот приводится относительно SEQ ID NO: 1.

2. Полипептид по п.1, где домен HA2 каждого мономера стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа усечен.

3. Полипептид по п.2, где С-концевая часть домена HA2 от положения 519 до С-концевой аминокислоты подвергнута делеции.

4. Полипептид по п.2, где С-концевая часть домена HA2 от положения 530 до С-концевой аминокислоты подвергнута делеции.

5. Полипептид по пп.2, 3 или 4, где С-концевая часть домена HA2 замещена аминокислотной последовательностью GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), необязательно присоединенной посредством линкера.

6. Полипептид по любому из пп.1-5, где С-концевой аминокислотный остаток С-концевого стеблевого сегмента HA1 каждого мономера стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа представляет собой любую аминокислоту, отличную от аргинина (R) или лизина (K), предпочтительно глутамин (Q).

7. Полипептид по п.1, где каждый мономер полипептида содержит аминокислотную последовательность

```
DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGSGGKYVCSAKLRMVTGLRNX1P
SX2QSQGLFGAIAGX3X4EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNK
VNSVIEKX5NTQX6TAX7GCEX8NKX9ERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENER
TLDHFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSE
ESKLNREKIDG (SEQ ID NO: 146),
```

где X_1 представляет собой K, X_2 представляет собой K, X_3 представляет собой F, X_4 представляет собой T, X_5 представляет собой M, X_6 представляет собой Y, X_7 представляет собой I, X_8 представляет собой Y и X_9 представляет собой S.

8. Полипептид по п.1, где каждый мономер полипептида содержит аминокислотную последовательность

```
DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGSGGKYVCSAKLRMVTGLRNX1P
SX2QSQGLFGAIAGX3X4EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI
EKX5NTQX6TAX7GCEX8NKX9ERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENERTLDHFHDSNVK
NLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLE
SMGVYQIEG (SEQ ID NO: 147),
```

где X_1 представляет собой K, X_2 представляет собой K, X_3 представляет собой F, X_4 представляет собой T, X_5 представляет собой M, X_6 представляет собой Y, X_7 представляет собой I, X_8 представляет собой Y и X_9 представляет собой S.

9. Полипептид по п.1, где каждый мономер полипептида содержит аминокислотную последовательность

```
DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGSGGKYVCSAKLRMVTGLRNX1P
SX2QSQGLFGAIAGX3X4EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI
EKX5NTQX6TAX7GCEX8NKX9ERCMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLLENERTLDHFHDSNVK
NLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLE
SMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 148),
```

где X_1 представляет собой K, X_2 представляет собой K, X_3 представляет собой F, X_4 представляет собой T, X_5 представляет собой M, X_6 представляет собой Y, X_7 представляет собой I, X_8 представляет собой Y и X_9 представляет собой S.

10. Полипептид по п.1, где каждый мономер полипептида содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164, 186, 202, 203, 207-216, 218-226 и 254-258.

11. Полипептид по п.10, где каждый мономер полипептида содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, 186, 202, 203, 207-216, 218-226 и 254-258.

12. Полипептид по любому из пп.1-11, который избирательно связывается с антителами CR6261 и/или CR9114.

13. Полипептид по п.1, где N-концевой стеблевой сегмент HA1 содержит аминокислотные остатки 18-52 HA1.

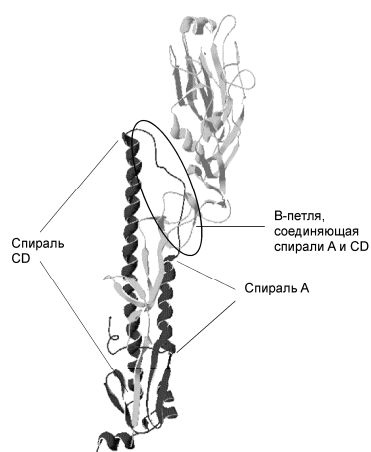
14. Полипептид по п.1, где домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего HA подтипа H1.

15. Молекула нуклеиновой кислоты для индукции иммунного ответа против вируса гриппа, кодирующая полипептид по любому из пп.1-14.

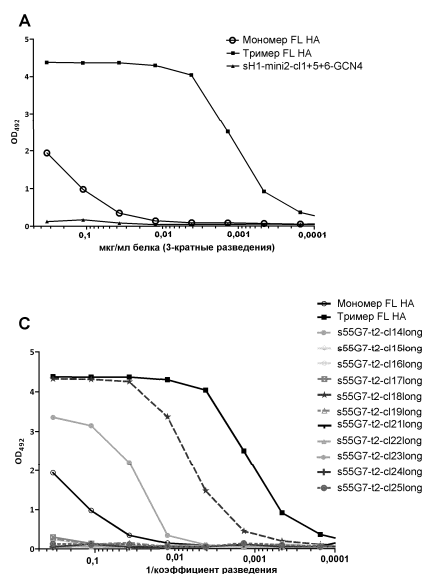
16. Вектор для индукции иммунного ответа против вируса гриппа, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.15.

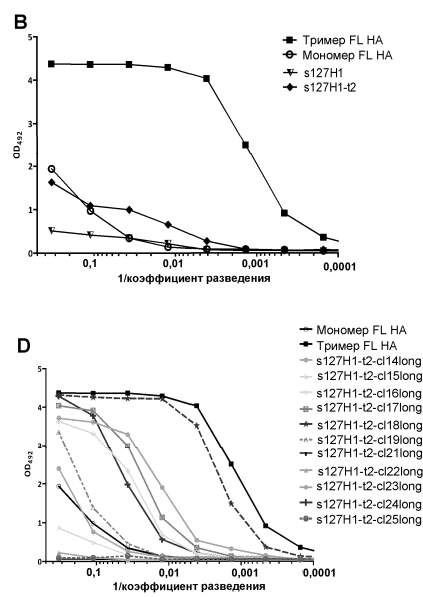
17. Композиция для индукции иммунного ответа против вируса гриппа, содержащая полипептид по любому из пп.1-14 и/или молекулу нуклеиновой кислоты по п.15.

18. Полипептид по любому из пп.1-14, молекула нуклеиновой кислоты по п.15 и/или вектор по п.16 для применения в качестве вакцины против гриппа.

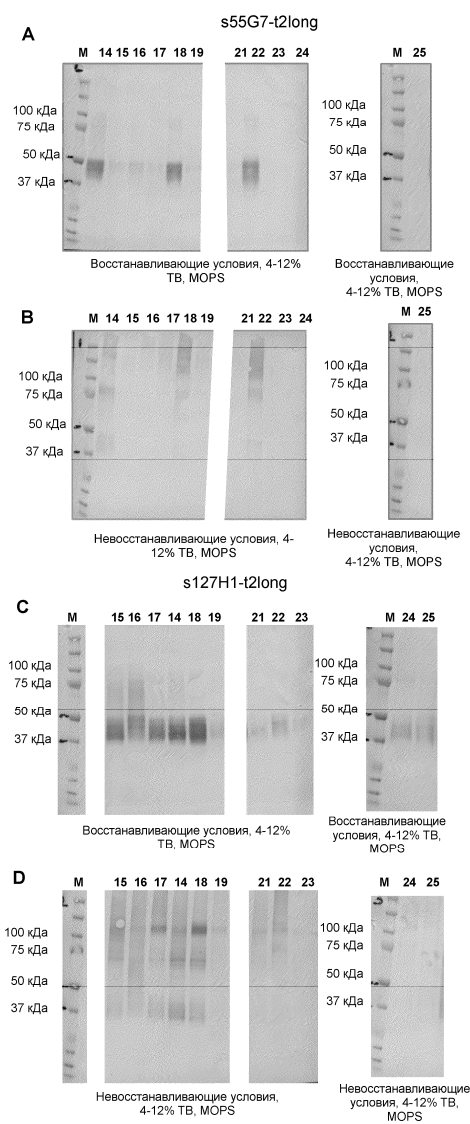


Фиг. 1

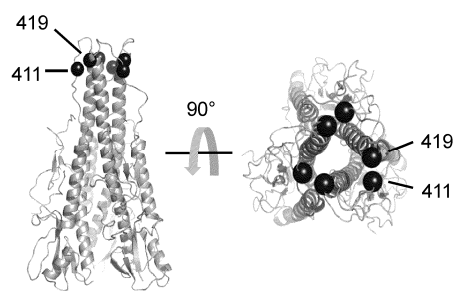




Фиг. 2

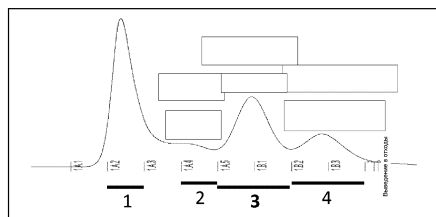


Фиг. 3



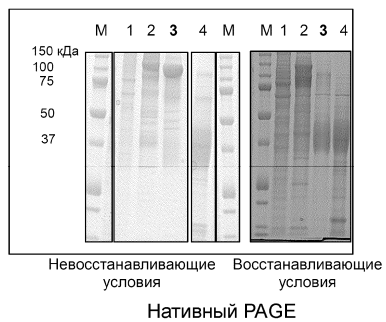
Фиг. 4

A



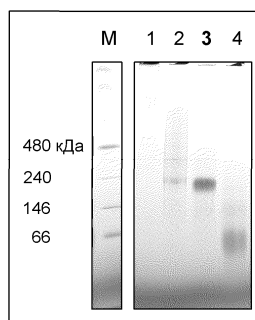
B

SDS-PAGE

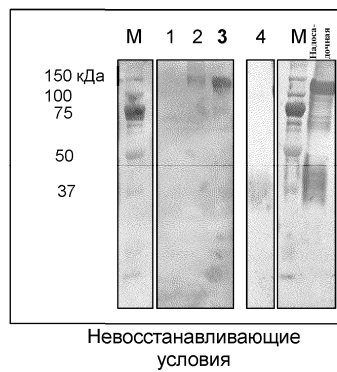


Нативный PAGE

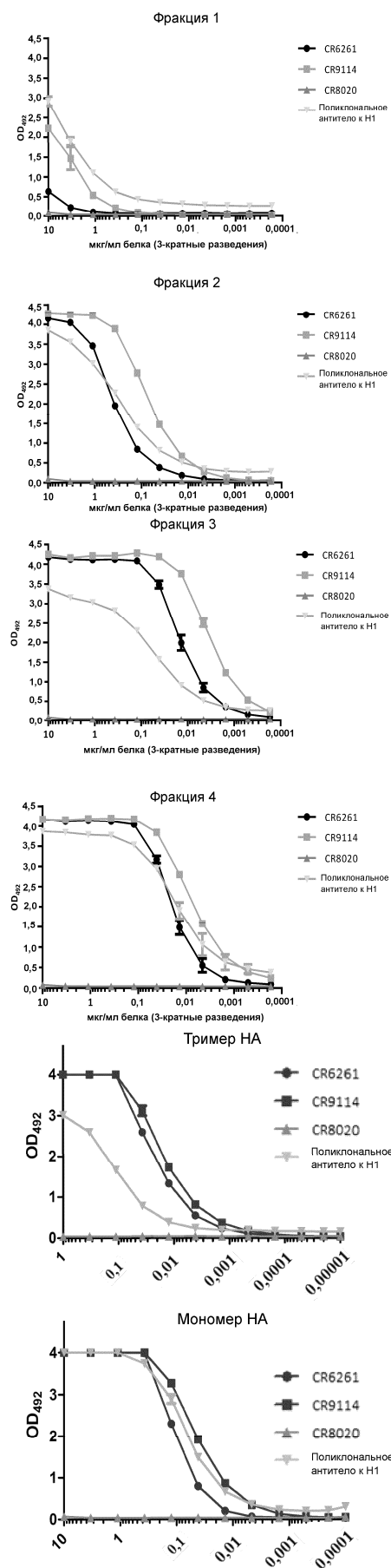
C



D

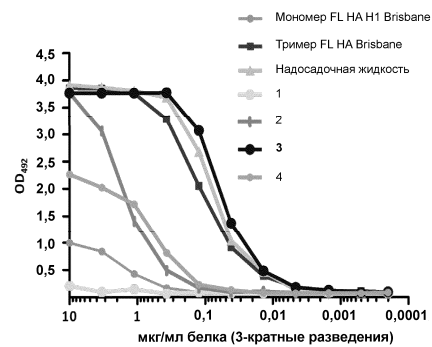
Вестерн-блоттинг
Поликлональное антитело к H1

Фиг. 5

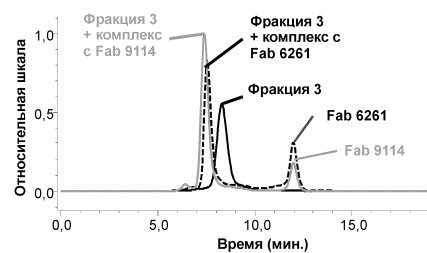
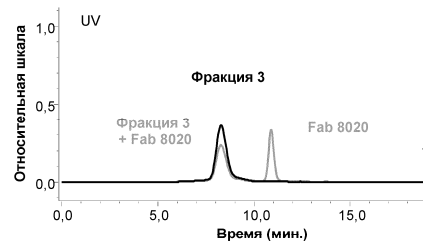


Фиг. 6

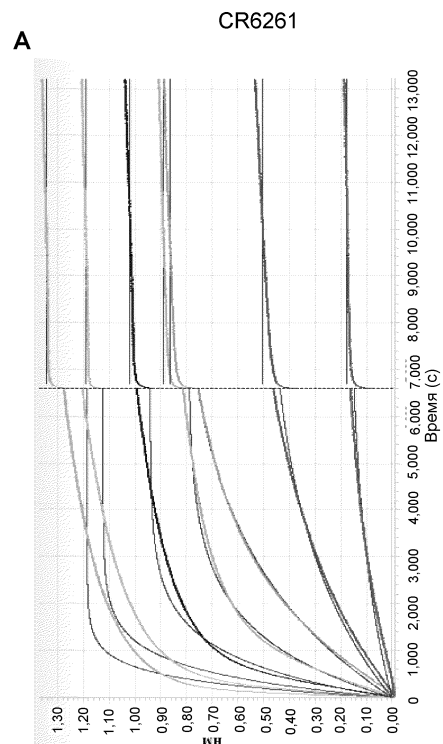
035375



Фиг. 7

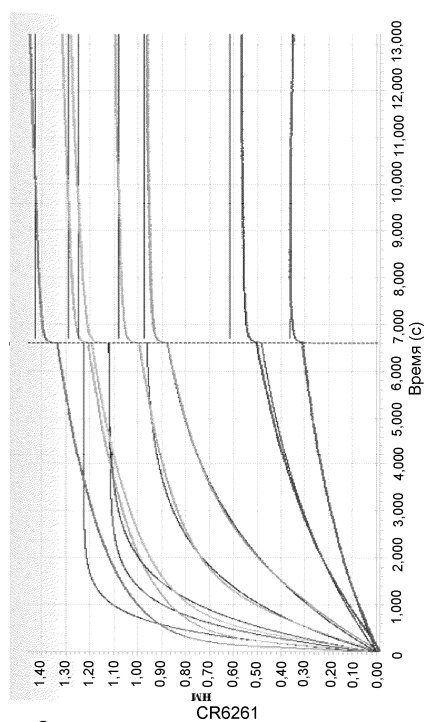


Фиг. 8



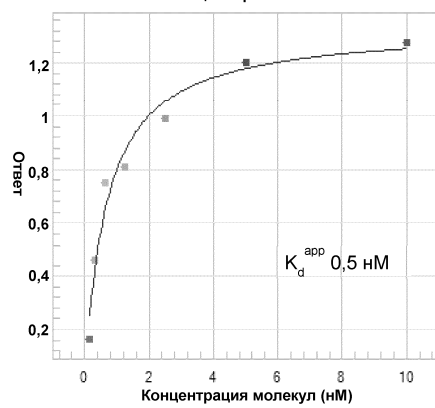
B

CR9114



C

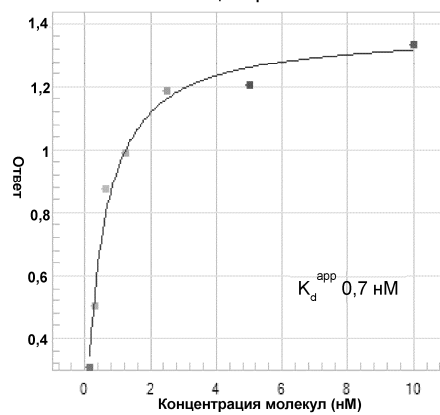
Анализ стационарного состояния



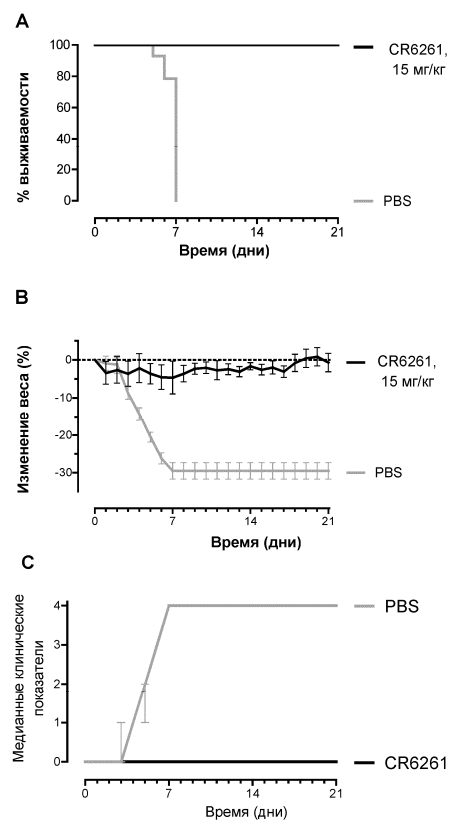
D

CR9114

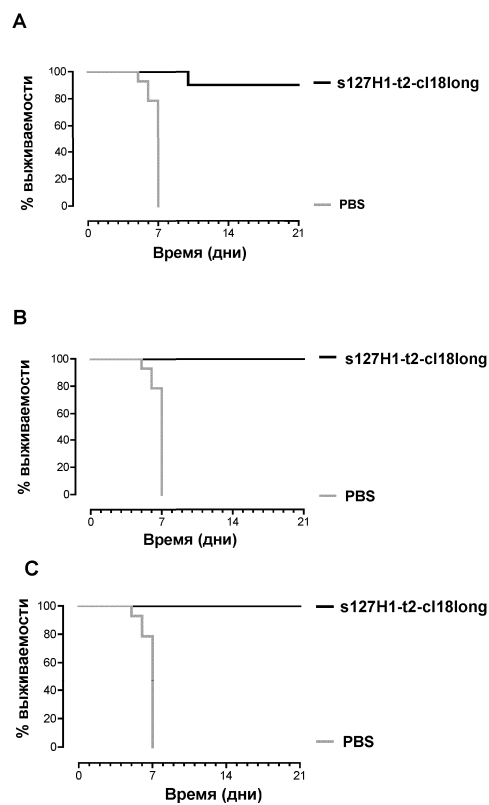
Анализ стационарного состояния



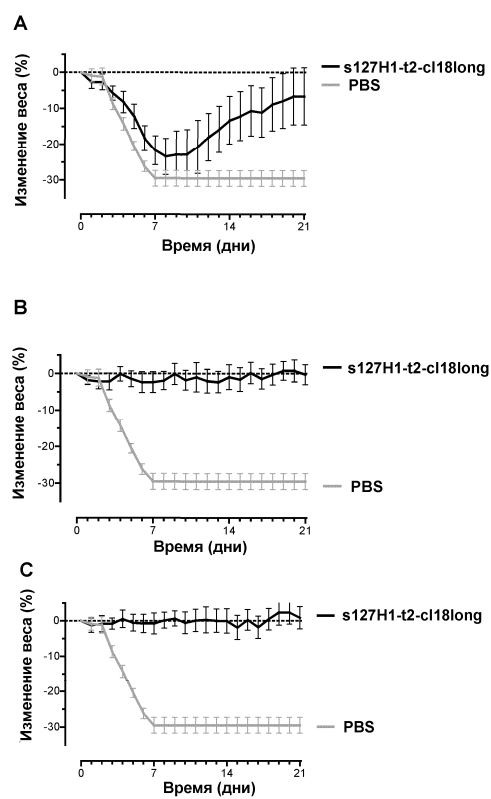
Фиг. 9



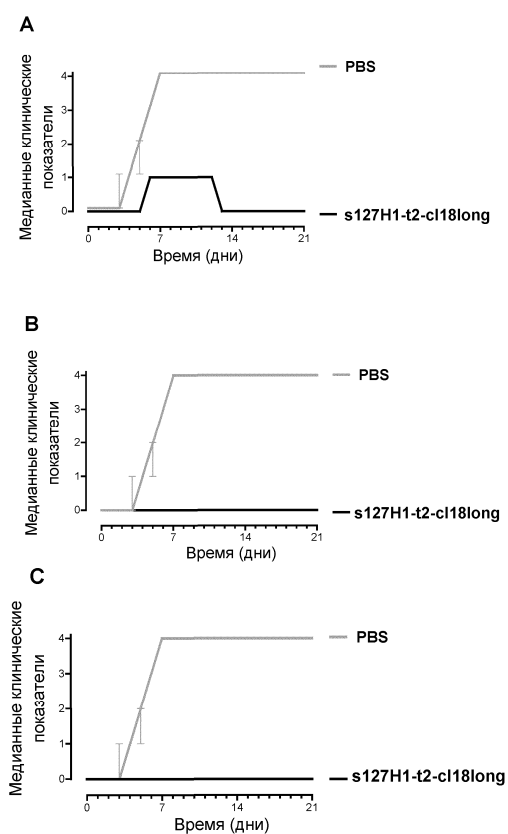
Фиг. 10



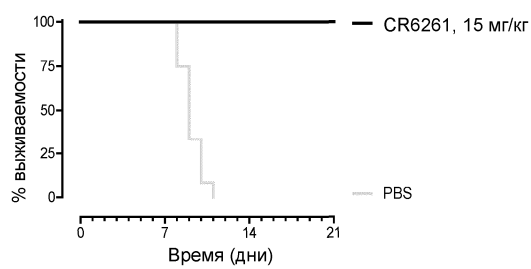
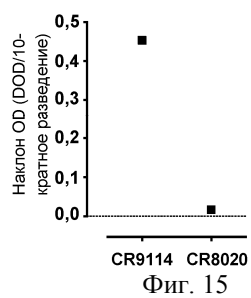
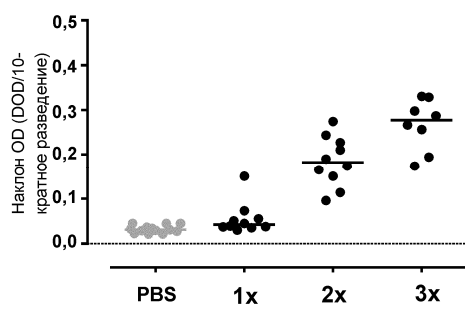
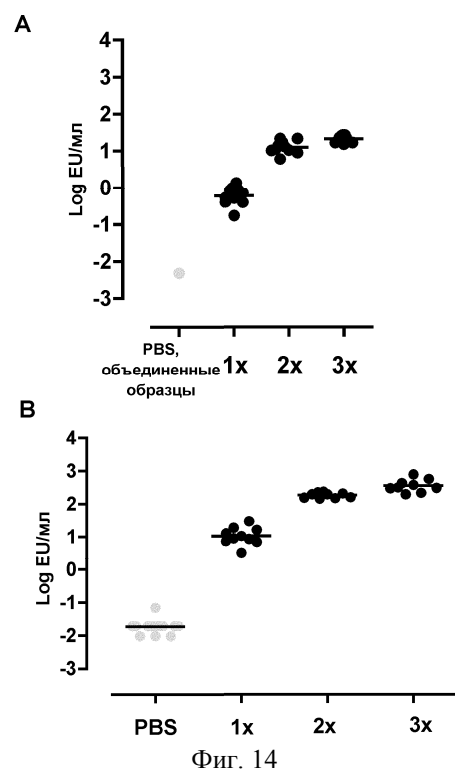
Фиг. 11



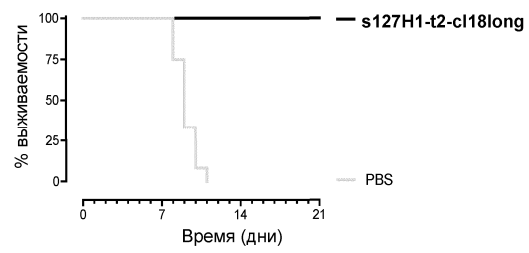
Фиг. 12



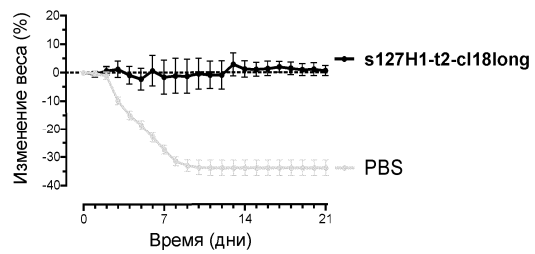
Фиг. 13



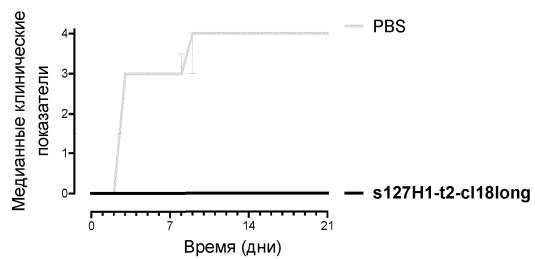
035375



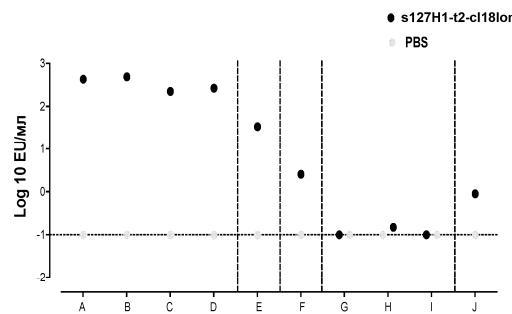
Фиг. 16В



Фиг. 16С

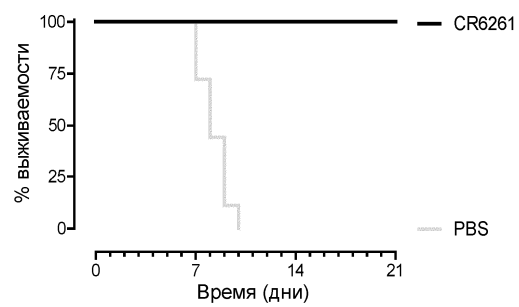


Фиг. 16D

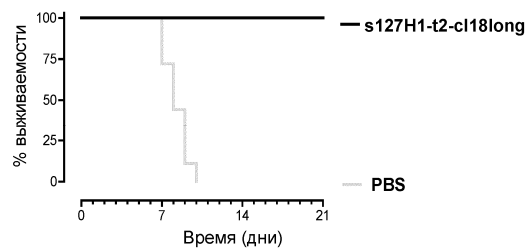


Код	Штамм
A	H1 A/Brisbane/59/2007
B	H1 A/California/07/09
C	H1 A/New Caledonia/20/1999
D	H1 A/Puerto Rico/8/1934
E	H5 A/Vietnam/1203/2004
F	H9 A/Hong Kong/ 1073/1999
G	H3 A/Brisbane/10/2007
H	H3 A/Wisconsin/67/2005
I	H3 A/Texas/50/2012
J	H7 A/Netherlands/219/03

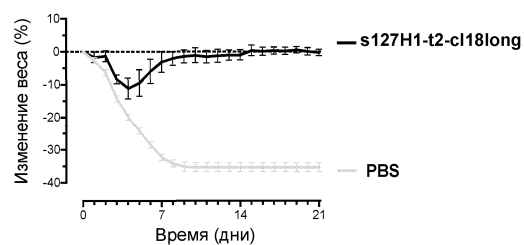
Фиг. 17



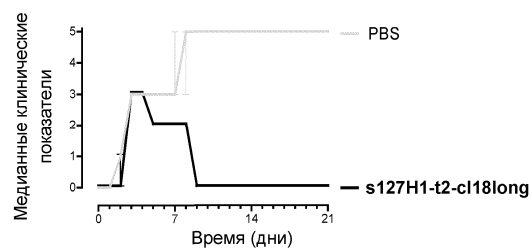
Фиг. 18А



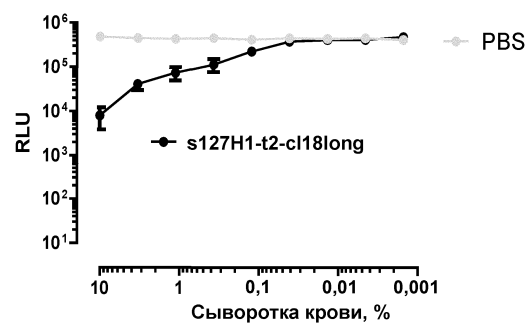
Фиг. 18В



Фиг. 18С

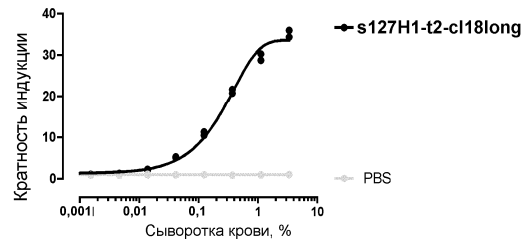


Фиг. 18D

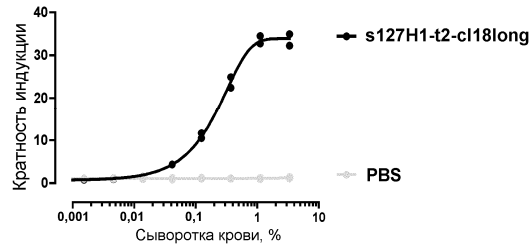


Фиг. 19

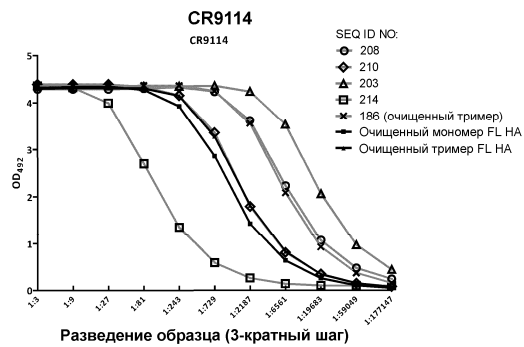
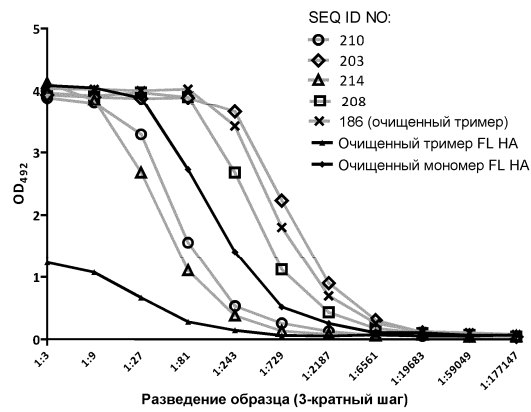
Мишень: FL HA H5 A/Hong Kong/156/97

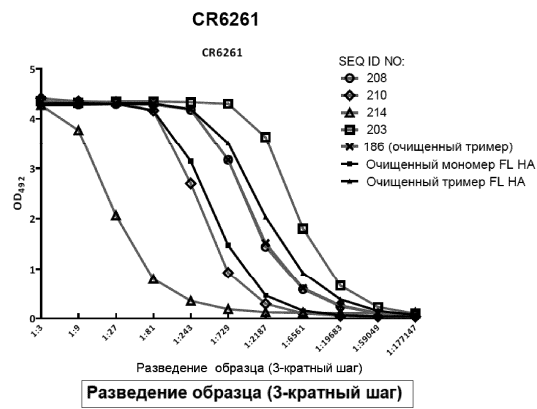


Мишень: FL HA H1 A/Brisbane/59/2007

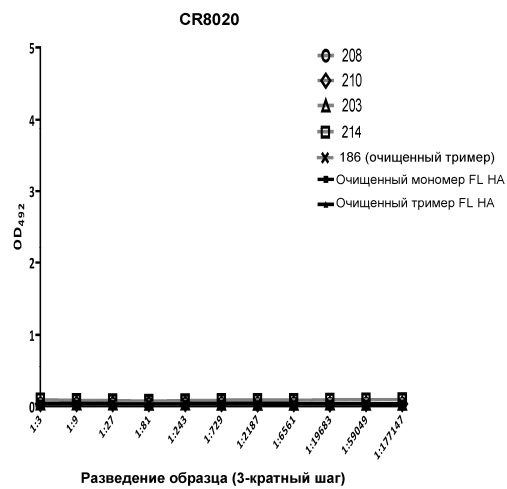


Сэндвич-ELISA с применением CR9114

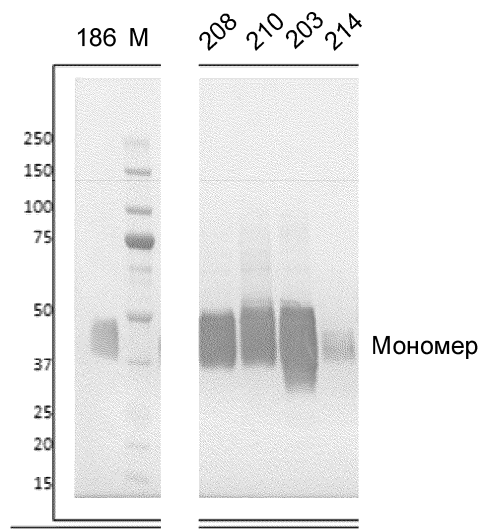


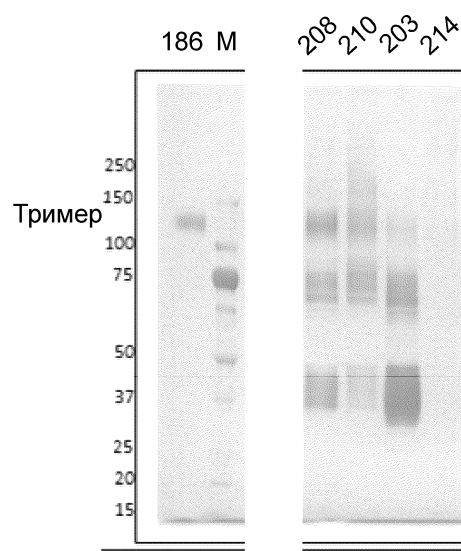


Фиг. 21C

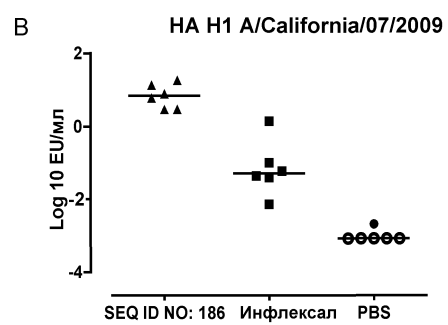
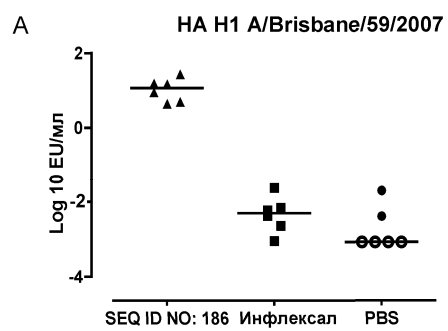


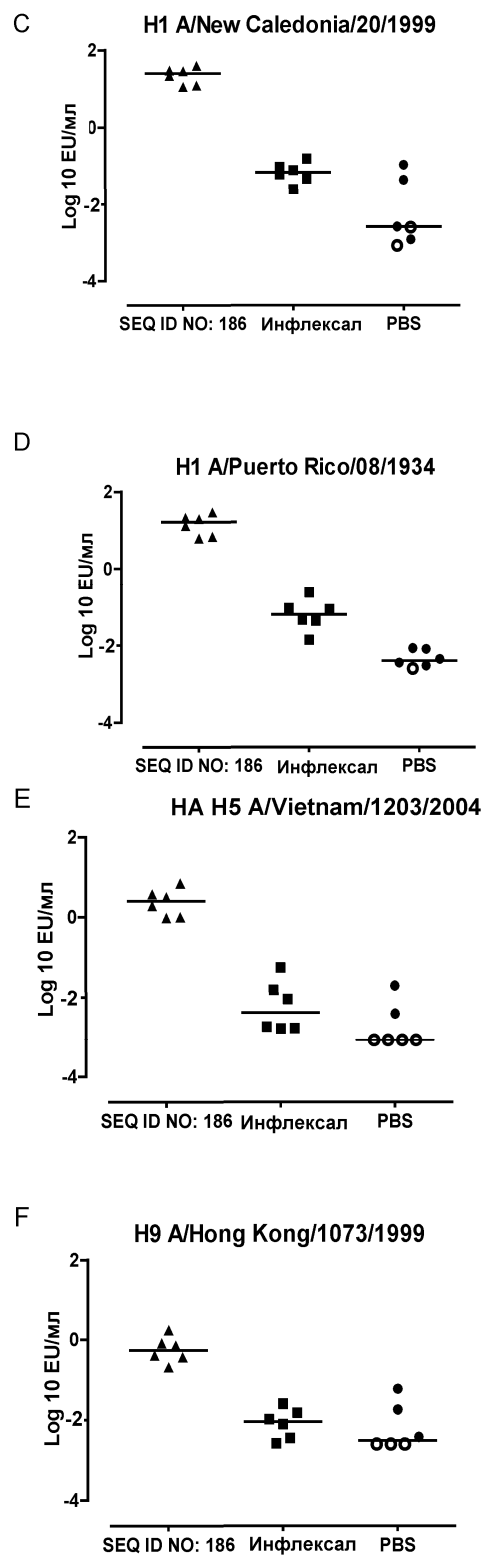
Фиг. 21D

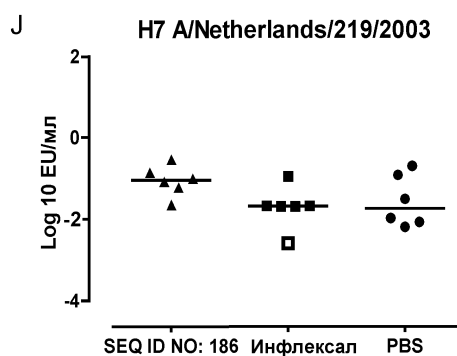
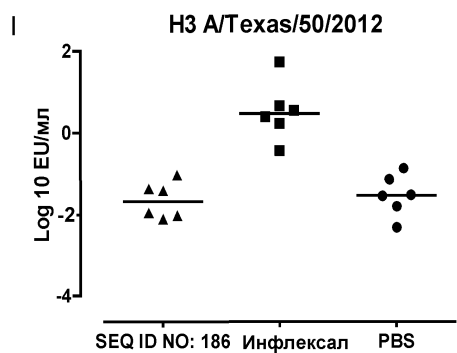
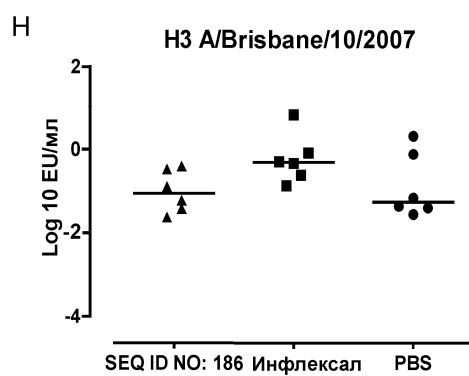
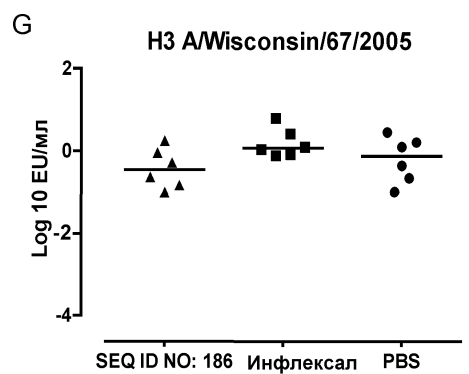




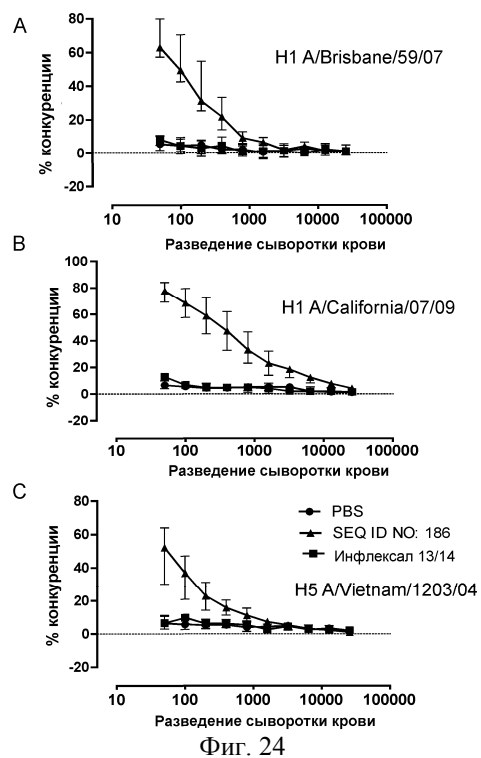
Фиг. 22



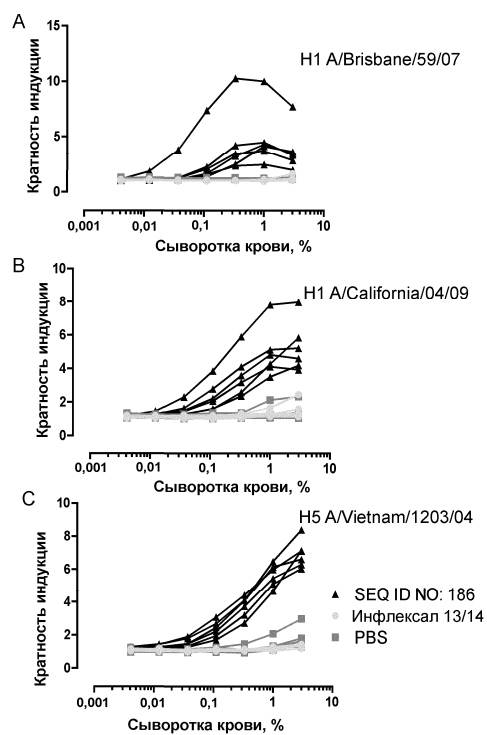




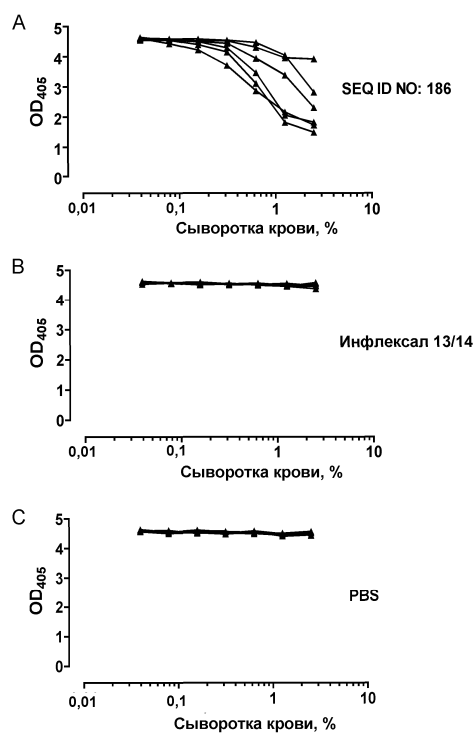
Фиг. 23



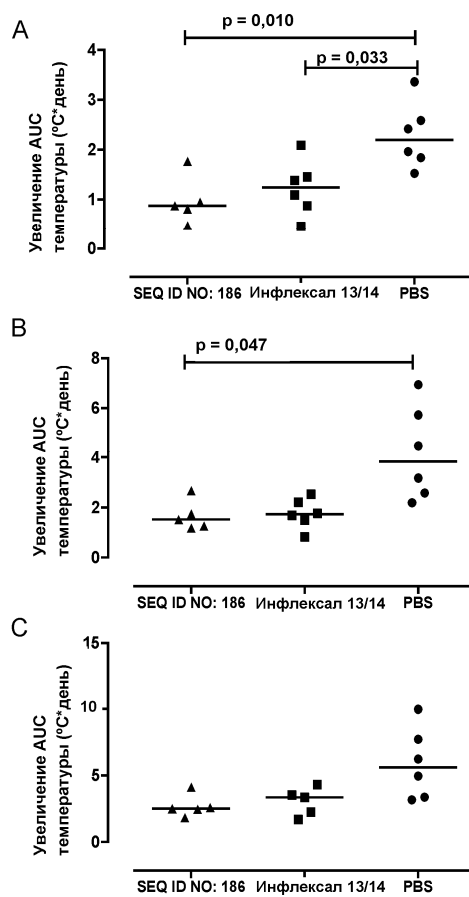
Фиг. 24



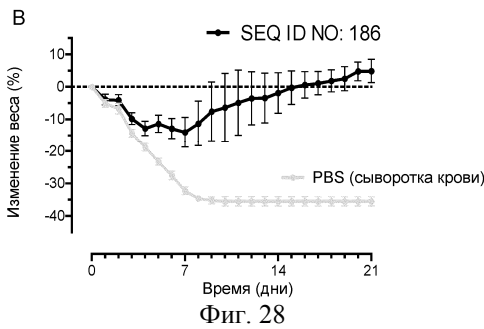
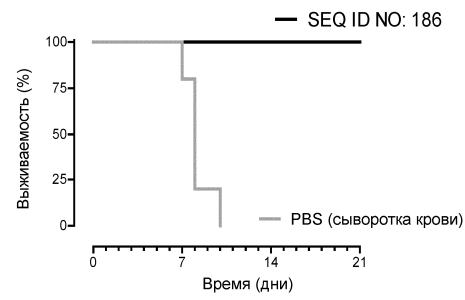
Фиг. 25



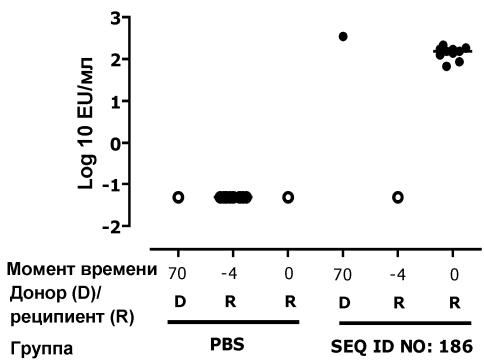
ФИГ. 26



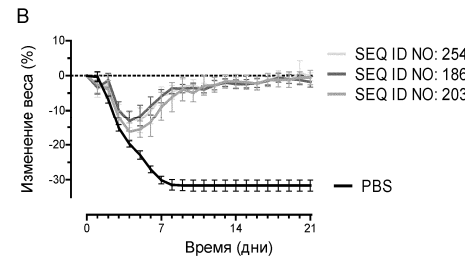
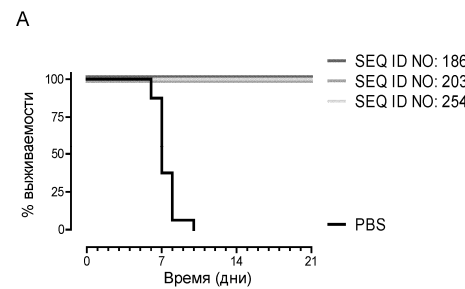
ФИГ. 27



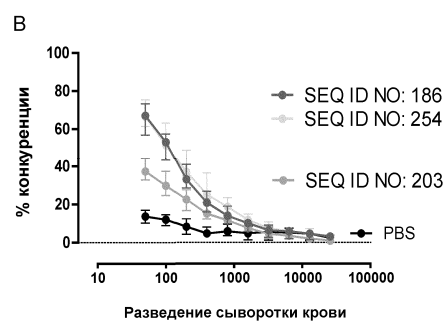
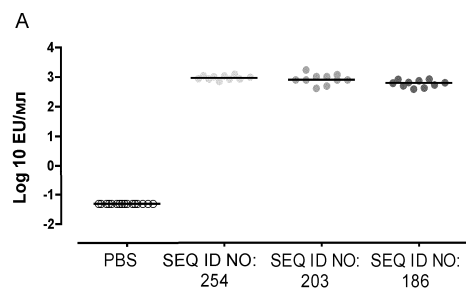
Фиг. 28



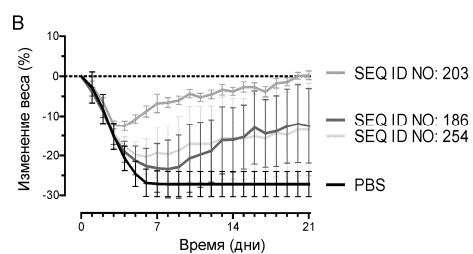
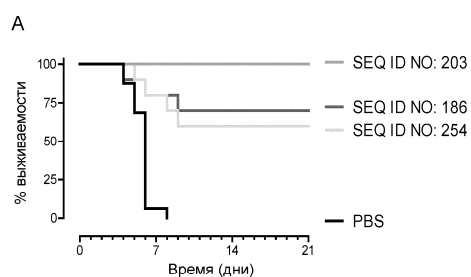
Фиг. 29



Фиг. 30

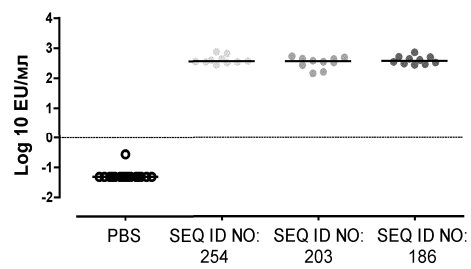


Фиг. 31

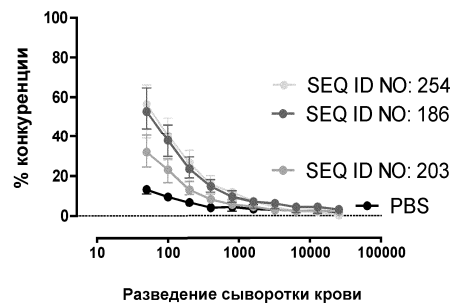


Фиг. 32

A

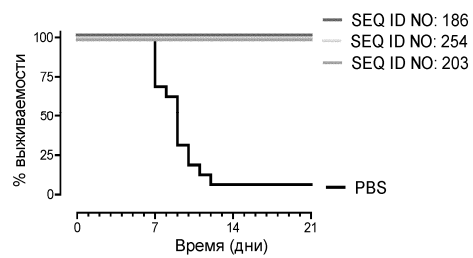


B

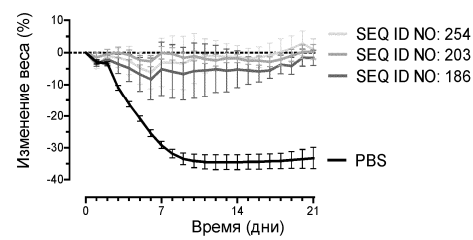


Фиг. 33

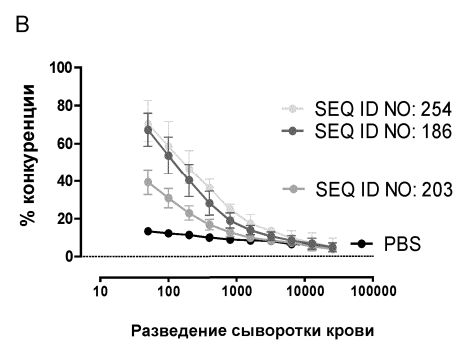
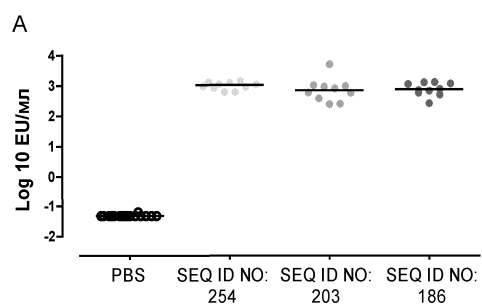
A



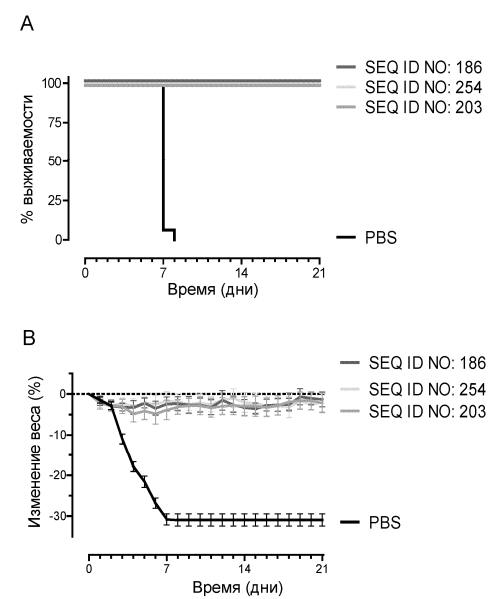
B



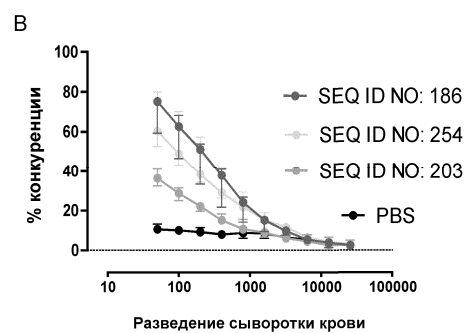
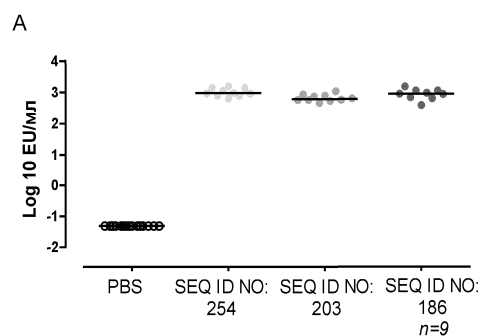
Фиг. 34



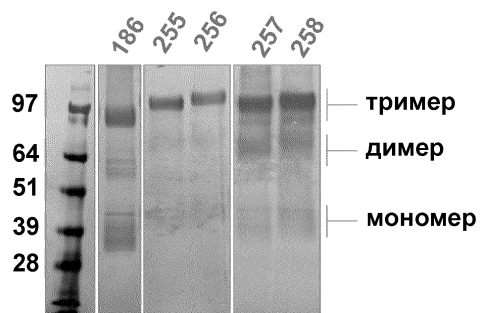
Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37



Фиг. 38