

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038400**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.08.23**

**(21)** Номер заявки  
**201692541**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.07.09**

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

---

**(54) ПОЛИПЕПТИД СТЕБЛЕВОГО ДОМЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 14176451.4; 62/062,746; 14195133.5

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

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

**(43)** 2017.05.31

**(86)** PCT/EP2015/065661

**(87)** WO 2016/005480 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)** 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. III, no. 25, 24 June 2014 (2014-06-24), pages E2514-E2523, XP055158737, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1402766111, cited in the application, 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

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, figure 1

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

WO-A1-2014191435

---

**(57)** Изобретение относится к полипептиду стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа А; кодирующей его молекуле нуклеиновой кислоты; содержащему ее вектору; содержащей их композиции и их применению для индукции иммунного ответа и в качестве вакцины против вируса гриппа А.

---

**B1**

**038400**

**038400 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" или "инфлюэнца"), которое колеблется по тяжести 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 миллионах случаев и ориентировочно от 300000 до 500000 смертей, связанных с гриппом. Большую часть этих инфекций можно отнести к вирусам гриппа А, несущим подтипы Н1 или Н3 гемагглютинина, при меньшем вкладе вирусов гриппа В, и, следовательно, 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 нейраминидаза (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 В/Yamagata/16/88 (также называемой В/Yamagata) и В/Victoria/2/87 (В/Victoria) (Ferguson et al., 2003). Хотя спектр заболеваний, вызываемых вирусами гриппа В, как правило, представлен более легкими формами, чем заболевания, вызываемые вирусами гриппа А, все же часто при инфицировании гриппом В наблюдается тяжелая болезнь, требующая госпитализации.

Известно, что антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, направлены главным образом к гемагглютинину (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 HAO). 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 иммунитет 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 et al., 2010). Steel et al., 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 et al.(2010) описали полипептид на основе HA2, содержащий аминокислотные остатки 1-172 из HA2, 7-аминокислотный линкер (GSAGSAG), аминокислотные остатки 7-46 из HA1, 6-аминокислотный линкер GSAGSA с последующими остатками 290-321 из HA1, с мутациями V297T, I300E, Y302T и C305T в HA1. 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 et al.(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 экспрессировали в *E.coli* и, следовательно, в них отсутствовали гликаны, которые являются частью природных белков HA. При экспрессии в *E.coli* полипептид извлекают в основном в виде высокомолекулярных агрегатов и незначительной мономерной фракции. Полипептид 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 LD<sub>90</sub> 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 из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934, H1N1 A/North Carolina/20/99 или H1N1 A/California/07/2009 и могут обеспечивать частичную защиту на модели умеренного контрольного заражения (1LD90) мышей с H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (т.е. в пределах одного и того же подтипа). Образцы сыворотки крови морских свинок, иммунизированных этими полипептидами, не проявляли выявляемых уровней нейтрализации при тестировании в анализе нейтрализации.

Совсем недавно Lu et al.(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.

В недавней статье Mallajosyula et al.(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). Полипептид 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 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. Полипептид, полученный из H5N1 A/Viet Nam/1203/2004, давал лишь ограниченную защиту в данной модели контрольного заражения. Более того, применяемая модель контрольного заражения является легкой моделью с относительно низкой вводимой дозой (1-2 LD90).

Таким образом, все еще существует потребность в безопасной и эффективной универсальной вак-

цине, 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 гемагглютинина вируса гриппа, способы получения полипептидов стеблевого домена, композиции, содержащие их, вакцины, содержащие их, и способы их применения.

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает новые иммуногенные полипептиды, содержащие стеблевой домен гемагглютинина вируса гриппа и не имеющие глобулярной головки, названные как полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (НА) гриппа. 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. С этой целью часть первичной последовательности белка НАО, составляющую головной домен, удаляют и оставшуюся аминокислотную последовательность заново соединяют, либо непосредственно, либо, в некоторых вариантах осуществления, посредством введения короткой гибкой сшивающей последовательности ("линкера") с восстановлением непрерывности аминокислотной цепи. Полученную последовательность дополнительно модифицируют путем введения специфических мутаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы НАО. Иммуногенные полипептиды не содержат полноразмерный НА1 домен вируса гриппа.

Настоящее изобретение обеспечивает новый полипептид стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, содержащий:

(а) домен НА1 гемагглютинина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент НА1, ковалентно соединенный с помощью линкерной последовательности из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом НА1, при этом указанный C-концевой сегмент НА1 соединен с (b) доменом НА2 гемагглютинина вируса гриппа, где домены НА1 и НА2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего НА подтипа Н1; и

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

(d) где указанный N-концевой сегмент НА1 содержит аминокислоты 1-х НА1, предпочтительно аминокислоты р-х НА1, и где C-концевой стеблевой сегмент НА1 содержит аминокислоты от у до C-концевой аминокислоты НА1, где 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);

(е) где область, содержащая аминокислотные остатки 402-418, содержит аминокислотную последовательность  $X_1NTQX_2TAX_3GKEX_4N(H/K)X_5E$  (K/R) (SEQ ID NO: 8), где

$X_1$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из М, Е, К, V, R и Т;

$X_2$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, T, H, L и Y, предпочтительно I, L или Y;

$X_3$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V, A, G, I, R, F и S, предпочтительно A, I или F;

$X_4$  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;

$X_5$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L, H, I, N, R, предпочтительно I;

(f) где аминокислотный остаток в положении 337 (домен НА1) выбран из группы, состоящей из I, E, K, V, A, и T,

аминокислотный остаток в положении 340 (домен НА1) выбран из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y,

аминокислотный остаток в положении 352 (домен НА2) выбран из группы, состоящей из D, V, Y, A, I, N, S, и T, и

аминокислотный остаток в положении 353 (домен НА2) выбран из группы, состоящей из K, R, T, E, G, и V; и

(g) где полипептид дополнительно содержит дисульфидный мостик между аминокислотой в положении 324 и аминокислотой в положении 436; и

(h) где дополнительная аминокислотная последовательность RМKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20) введена в положения 419-433 или где последовательность RМKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) введена в положения 417-433.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат полный домен НА2, т.е. домен

HA2, включающий в себя трансмембранный домен и внутриклеточную последовательность. В определенных вариантах осуществления домен HA2 был усечен. 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, 526, 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).

Полипептиды по настоящему изобретению являются существенно меньшими, чем HAO, 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 составляют от приблизительно 250 до приблизительно 350, предпочтительно от приблизительно 260 до приблизительно 340, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330 аминокислот в длину.

Полипептиды по настоящему изобретению содержат консервативные эпитопы стеблевого домена группы 1 перекрестно-нейтрализующего антитела CR6261 (описанного в WO 2008/028946) и/или антитела CR9114 (описанного в WO 2013/007770), антитела, способного к связыванию и нейтрализации одновременно вирусов гриппа А группы 1 и группы 2, а также вирусов гриппа В. Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения заключается в обеспечении полипептидов стеблевого домена HA, где указанные полипептиды стабильно представляют эпитопы антитела CR6261 и/или CR9114, как показано посредством связывания указанного антитела или антител с указанными полипептидами. В одном варианте осуществления полипептиды не связываются с CR8020 и CR8057 (описанными в WO 2010/130636), которые являются моноклональными антителами, связывающимися только с вирусами гриппа H3.

Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, обеспечиваемые в настоящем документе, подходят для применения в иммуногенных композициях (например, вакцинах), способных генерировать иммунные ответы против одного/или множества штаммов вируса гриппа А и/или В, в частности, против вируса гриппа подтипа H1. В одном варианте осуществления полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа способны генерировать иммунные ответы против штаммов вируса гриппа А филогенетической группы 1 и/или группы 2, в частности, против штаммов вируса гриппа как филогенетической группы 1, так и группы 2. В одном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ против гомологичных штаммов вируса гриппа. В одном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ против гетерологичных штаммов вируса гриппа одного и того же и/или разных подтипов. В дополнительном варианте осуществления полипептиды способны генерировать иммунный ответ 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 HA 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, и/или вектора согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает композиции, содержащие полипептид и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор согласно настоящему изобретению. Композиции предпочтительно представляют собой иммуногенные композиции. Композиции, обеспечиваемые в настоящем документе, могут находиться в любой форме, которая позволяет вводить композиции субъекту, например мышам, хорькам или людям. В конкретном варианте осуществления 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 векторы для применения в качестве вакцины. Настоящее изобретение, в частности, относится к иммуногенным полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или векторам 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, в частности, заболевания или состояния, вызываемого вирусом гриппа, содержащего HA подтипа H1.

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

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана модель мономера HA в состоянии до слияния, представленная в виде нативного тримера. HA1 показан светло-серым, HA2 показан темно-серым. Указаны спираль A (важная часть эпитопа CR6261) и спираль CD (часть контактной поверхности тримера), как и петля, соединяющая эти элементы вторичной структуры. Также указаны C-конец HA1 и N-конец HA2. Пептид слияния расположен на N-конце HA2.

Фиг. 2. Результаты сэндвич-ELISA, полученные для надосадочных жидкостей культур, экспрессирующих SEQ ID NO: 65-71 и SEQ ID NO: 76-78, раскрыты в PCT/EP2014/060997. Захватывающие и детекторные антитела указаны над графиком. Mini-HA относится к растворимому варианту SEQ ID NO: 2, где эквивалент остатка 519-565 был замещен RSLVPRGSPGHHHHHH; при этом FL-HA-FFH относится к растворимому варианту SEQ ID NO: 1, содержащему C-концевую последовательность Flag-thrombin-foldon-His (SEQ ID NO: 4) от положения 520; FL-HA-7xHis относится к растворимому варианту SEQ ID NO: 1, содержащему C-концевую последовательность EGRHHHHHHHH от положения 530.

Фиг. 3. Результаты сэндвич-ELISA, полученные для надосадочных жидкостей культур, экспрессирующих полипептиды по настоящему изобретению, которые содержат полученную из GCN4 последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20) в положениях 419-433 (варианты t2). Захватывающие и детекторные антитела указаны над графиком. Mini-HA-t2 получают из Mini-HA путем введения SEQ ID NO: 20 в положения 419-433; FL-HA-FFH, FL-HA-7xHis, как указано выше.

Фиг. 4. Результаты сэндвич-ELISA, полученные для надосадочных жидкостей культур, экспрессирующих полипептиды по настоящему изобретению, которые содержат полученную из GCN4 последовательность RMKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) в положениях 417-433 (варианты t3). Захватывающие и детекторные антитела указаны над графиком. Mini-HA-t3 получают из Mini-HA путем введения SEQ ID NO: 21 в положения 417-433; FL-HA-FFH, FL-HA-7xHis, как указано выше.

Фиг. 5. Профили элюирования s55G7-t2, s127H1-t2 и s86B4-t2 из колонки для эксклюзионной хроматографии Superdex 200, заключительная стадия процедуры очистки. Пронумерованные линии под хроматограммой указывают на фракции, собранные в ходе процесса элюирования.

Фиг. 6. Анализ фракций, собранных в ходе элюирования в колонке для эксклюзионной хроматографии Superdex 200, с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Числа соответствуют фракциям, указанным на фиг. 5. Для выявления на вестерн-блоттинге применяли антитело, распознающее C-концевую His-метку.

Фиг. 7. Эксклюзионная хроматография (аналитическая колонка Tosoh G2000) в отношении s127H1-t2 в присутствии и при отсутствии Fab-фрагментов нейтрализующих антител широкого спектра действия CR9114, CR6261 и CR8020. Значения молекулярного веса отдельных белков и/или комплексов определены посредством многоугольного светорассеяния в ходе элюирования из колонки, и они приведены в табл. 8.

Фиг. 8. Связывание полипептида s127H1-t2 по настоящему изобретению с моноклональными антителами CR6261 и CR9114 с применением биослойной интерферометрии. Верхние панели показывают индивидуальные кривые связывания для иммобилизованных моноклональных антител под воздействием различных концентраций s127H1-t2, нижние панели показывают анализ в равновесном состоянии, используемый для оценки  $K_d$ .

Фиг. 9. Выживаемость (A), потеря веса тела (B) и клинический показатель (C) для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контроля. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой ( $25 \times LD_{50}$ ) 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 (B) или межквартильный размах (C).

Фиг. 10. Выживаемость (A), потеря веса тела (B) и клинический показатель (C) для экспериментальных групп, иммунизированных (3 иммунизации с интервалами в 3 недели) 10 мкг s127H1-t2, либо в присутствии, либо при отсутствии 10 мкг Matrix-M. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой ( $25 \times LD_{50}$ ) 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 (B) или межквартильный размах (C)

Фиг. 11. Результаты ELISA для сыворотки крови в группах отрицательного контроля и экспериментальных группах с применением s127H1-t2 (A) или растворимой формы полноразмерного HA (B) в качестве антигена. Полосы представляют медианное значение.

Фиг. 12. Антитела, индуцированные после иммунизации полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению с добавленным вспомогательным средством, способны конкурировать с CR9114 за связывание с полноразмерным HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в конкурентном ELISA (A). В целях сравнения на отдельном графике показаны уровни конкуренции с моноклональными антителами немеченным CR9114 (т.е. самоконкуренции) и несвязывающими CR8020 и CR-JB, оба из которых находятся в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл.

Фиг. 13. Выживаемость (A), относительная потеря веса тела (B) и клинический показатель (C) для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контроля. 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 (B) или межквартильный размах (C).

Фиг. 14. Выживаемость для групп, иммунизированных 1 раз (A), 2 раза (B) или 3 раза (C) 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-M. 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. 15. Относительное изменение веса тела для групп, иммунизированных 1 раз (A), 2 раза (B) или 3 раза 30 мкг S127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-M. 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. 16. Клинические показатели для групп, иммунизированных 1 раз (A), 2 раза (B) или 3 раза 30 мкг s127H1-t2-cl18long в присутствии 10 мкг Matrix-M. 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. 17. 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 (A) или растворимой формы полноразмерного HA (B) в качестве антигена. Полосы представляют медианное значение.

Фиг. 18. Антитела, индуцированные после иммунизации полипептидом s127H1-t2-cl18long по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M способны конкурировать с CR9114 за связывание с полноразмерным HA H1N1 A/Brisbane/59/07 в конкурентном ELISA (A). В целях сравнения на отдельном графике (B) 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. 19. (A) Выживаемость для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контроля. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (12,5×LD50) H5N1 A/Hong Kong/156/97 через четыре недели после последней иммунизации. (B) Выживаемость, (C) относительное изменение веса тела и (D) медианные клинические показатели для группы, иммунизированной 3 раза 30 мкг s127H1-t2 в присутствии 10 мкг Matrix-M. Планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал (C) 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 B, C, D также показана группа отрицательного контроля (PBS).

Фиг. 20. Результаты ELISA для образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных 3 раза полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению согласно описанному в примере 5, с применением полноразмерных HA из ряда штаммов вируса гриппа группы I (H1, H5 и H9) и группы II (H3 и H7) в качестве антигена. Индуцированные антитела распознают все тестируемые FL HA из группы I.

Фиг. 21. (A) Выживаемость для групп отрицательного (PBS, 3 иммунизации с интервалами в 3 недели) и положительного (15 мг/кг CR6261, 1 день до контрольного заражения) контроля. Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (12,5×LD50) H1N1 A/Brisbane/59/2007 через четыре недели после последней иммунизации. (B) Выживаемость, (C) относительное изменение веса тела и (D) медианные клинические показатели для группы, иммунизированной 3 раза 30 мкг s127H1-t2 в присутствии 10 мкг Matrix-M. Планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал (C) или межквартильный размах (D). Мышей подвергали контрольному заражению летальной дозой (12,5×LD50)

H1N1 A/Brisbane/59/2007 через четыре недели после последней иммунизации и отслеживали в течение 21 дня. В целях сравнения на B, C, D также показана группа отрицательного контроля (PBS).

Фиг. 22. Анализ нейтрализации псевдочастиц с применением образцов сыворотки крови от мышей, иммунизированных полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению или PBS.

Фиг. 23. Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в модели. Образцы сыворотки крови мышей, иммунизированных полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению, проявляют 30-40-кратную индукцию активности передачи сигналов через FcγRIV при наиболее высоких сывороточных концентрациях при применении клеток-мишеней, трансфицированных FL HA H5N1 A/Hong Kong/156/97 (A) или H1N1 A/Brisbane/59/07 (B), в качестве источника антигена.

Фиг. 24. 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 9.

Фиг. 25. 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. 26. Выживаемость (A) и % изменение веса тела (B) мышей после иммунизации и контрольного заражения H1N1 A/NL/602/09 согласно описанному в примере 10.

Фиг. 27. (A): титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 10. 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 10. В качестве антигена применяли FL HA H1N1 A/Brisbane/59/2007. Показанные данные представляют собой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах. Указаны данные для CR9114 и CR8020 с использованием исходного раствора с 5 мкг/мл и разведения аналогично образцам сыворотки.

Фиг. 28. Первичный скрининг в отношении в общей сумме 10472 клонов (5544 и 4928 из набора 1 и 2, соответственно). Данные нормализованы в отношении среднего значения связывания и экспрессии FL HA, включенных в эксперимент. 20% наилучших клонов из анализа сэндвич-ELISA с применением CR9114 (панель A), также характеризующихся экспрессией FL HA при уровне экспрессии >50% и сигналами связывания с CR6261 при уровне >80% сигналов, наблюдаемых в случае использования FL HA (панель B), считали хитами; при этом данная процедура давала 703 хитов (596 и 107 из библиотек 1 и 2, соответственно).

Фиг. 29. Результаты сэндвич-ELISA с применением CR9114 для полипептидов по настоящему изобретению (A) под SEQ ID NO: 158-162, где все содержат C-концевую последовательность Flag-foldon-His (B) под SEQ ID NO: 163-166, где все содержат C-концевую последовательность TCS-His.

Фиг. 30. Результаты SEC MALS для SEQ ID NO: 158 в присутствии и при отсутствии Fab-фрагментов CR9114 (указан как CRF9114) или CR6261 (указан как CRF6261). Значение молекулярной массы, полученное благодаря анализу многоугольного светорассеяния, приведено в примере 12 и указывает на образование комплексов с 3 Fab-фрагментами на тример полипептида по настоящему изобретению.

Фиг. 31. Выживаемость (A) и % изменение веса тела (B) мышей после иммунизации и контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07 согласно описанному в примере 13.

Фиг. 32. (A): титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 13. 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. Указаны уровни для CR9114 и CR8020 с использованием исходного раствора с 5 мкг/мл и разведения аналогично образцам сыворотки.

Фиг. 33. Выживаемость (A) и % изменение веса тела (B) мышей после иммунизации и контрольного заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97 согласно описанному в примере 14.

Фиг. 34. (A): титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 14. 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 со-

бой групповые медианные значения, планки погрешностей обозначают межквартильный размах. Указаны уровни для CR9114 и CR8020 с использованием исходного раствора с 5 мкг/мл и разведения аналогично образцам сыворотки.

Фиг. 35. Выживаемость (А) и % изменение веса тела (В) мышей после иммунизации и контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 согласно описанному в примере 15.

Фиг. 36. (А): титры полноразмерного HA (H1N1 A/Brisbane/59/2007), определенные посредством ELISA у мышей, иммунизированных согласно описанному в примере 15. Данные анализировали с применением подхода на основе определения средневзвешенного наклона. Незакрашенные символы обозначают измерения при LOD. Полосы обозначают медианные значения. (В): 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. Указаны уровни для CR9114 и CR8020 с использованием исходного раствора с 5 мкг/мл и разведения аналогично образцам сыворотки.

### Определения

Ниже даны определения терминов, используемых в настоящем изобретении.

Аминокислота согласно настоящему изобретению может быть любой из 20 природных (или "стандартных" аминокислот) или их вариантами, такими как, например, D-пролин (D-энантиомер пролина), или любыми вариантами, которые не обнаружены в природе в белках, такими как, например, норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают особыми свойствами, например цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который образует цикл с полипептидным каркасом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В табл. 2 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 et al.(1984)).

"Консервативная замена" относится к замене аминокислоты одного класса другой аминокислотой того же класса. В конкретных вариантах осуществления консервативная замена не изменяет структуру или функцию, или и то, и другое, полипептида. Классы аминокислот для 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 продолжитель-

ности 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.

Подразумевают, что применяемое в настоящем документе выражение "хозяин" относится к организму или клетке, в которую был введен вектор, такой как вектор для клонирования или вектор экспрессии. Организм или клетка могут быть прокариотическими или эукариотическими. Предпочтительно хозяин включает выделенные клетки-хозяева, например, клетки-хозяева в культуре. Выражение "клетки-хозяева" означает лишь, что клетки модифицировали для (сверх)-экспрессии полипептидов по настоящему изобретению. Следует понимать, что 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.

Предусматривается, что вслед за применяемым в настоящем документе выражением "включенный" или "включающий" следуют 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: род А, В и С. Выражение "подтип вируса гриппа", применяемое в настоящем документе, относится к вариантам вируса гриппа А, которые характеризуются комбинациями поверхностных вирусных белков гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). Согласно настоящему изобретению подтипы вируса гриппа могут быть названы по их номеру Н, такому как, например, "вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3", "вирус гриппа подтипа Н3" или "грипп Н3", или по комбинации номера Н и номера N, такой как, например, "подтип Н3N2 вируса гриппа" или "Н3N2". Термин "подтип" специфически включает все индивидуальные "штаммы" в пределах каждого подтипа, которые, как правило, являются результатом мутаций и показывают различные патогенные профили, в том числе природные изоляты, а также искусственные мутанты или реассортанты и т.п. Такие штаммы также можно называть различными "изолятами" вирусного подтипа. Соответственно, применяемые в настоящем документе термины "штаммы" и "изоляты" можно применять взаимозаменяемо. 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: *inter alia* подтипы Н1, Н2, Н5 и Н9 в филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1") и *inter alia* подтипы Н3, Н4, Н7 и Н10 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 двунитевой. 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 терапевтических средств, гибридизационных зондов и праймеров для ПЦР.

Применяемая в настоящем документе в определенных вариантах осуществления нумерация аминокислот в НА основана на нумерации аминокислот в НАО вируса гриппа дикого типа, например, нумерации аминокислот в штамме вируса гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Применяемая в настоящем изобретении формулировка "аминокислота в положении "x" в НА", таким образом, означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении x в НАО определенного 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 всем описании, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого белка НАО (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 НАО 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) гемагглютинина (НА). Как правило, полипептид стеблевого домена представляет собой одну полипептидную цепь (т.е. соответствует стеблевому домену полипептидного гемагглютинина НАО) или две полипептидные цепи (т.е. соответствует стеблевому домену полипептидного гемагглютинина 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.

Выражение "вектор" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена вторая молекула нуклеиновой кислоты для введения хозяину, где она будет реплицироваться и в некоторых случаях экспрессироваться. Другими словами, вектор способен транспортировать молекулу нуклеиновой кислоты, к которой он был присоединен. Под применяемым в данном документе термином "вектор" подразумеваются векторы для клонирования, а также векторы экспрессии. Векторы включают, без ограничений, плазмиды, космиды, бактериальные искусственные хромосомы (ВАС) 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 предпо-

лагаемым 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 дополнение, выбор соответствующих вакцинных штаммов представляет много сложностей и часто приводит к недостаточной защите. Более того, прогнозирование подтипа следующего пандемического вируса, в том числе того, когда и где он появится, в настоящее время невозможно.

Гемагглютинин (HA) 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. HA содержит крупный эктодомен из ~500 аминокислот, который расщепляется ферментами хозяина с образованием двух полипептидов, остающихся соединенными дисульфидной связью. Большая часть N-концевого фрагмента (HA1, 320-330 аминокислот) образует мембранно-дистальный глобулярный домен, который содержит рецептор-связывающий участок и большинство детерминант, распознаваемых антителами, нейтрализующими вирус. Меньшая C-концевая часть (HA2, ~180 аминокислот) образует стеблеподобную структуру, которая заякоривает глобулярный домен на клеточной или вирусной мембране. Степень гомологии последовательности между подтипами является меньшей для полипептидов HA1 (34-59% гомология между подтипами), чем для полипептидов HA2 (51-80% гомология). Наиболее консервативная область представляет собой последовательность вблизи участка расщепления, в частности 23 N-концевые аминокислоты HA2, которые являются консервативными среди всех подтипов вируса гриппа А (Logieau et al., 2010). Часть этой области доступна в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице HA (HA0), но становится недоступной после расщепления HA0 на HA1 и HA2.

Большинство нейтрализующих антител связываются с петлями, которые окружают 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 высоко консервативным эпитопам в стеблевом домене белка HA вируса гриппа (Throsby et al., 2008; Ekiert et al., 2009, WO 2008/028946, WO 2010/130636, WO 2013/007770).

Полипептиды стеблевого домена, стабильно представляющие эпитопы этих антител, описаны в одновременно находящейся на рассмотрении заявке на патент PCT/EP2012/073706. 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 PCT/EP2014/060997.

По настоящему изобретению были сконструированы новые полипептиды стеблевого домена HA, 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 HA для создания полипептида стеблевого домена, также называемого mini-HA, чтобы перенаправить иммунный ответ на стеблевой домен, где расположены эпитопы нейтрализующих антител широкого спектра действия. Нейтрализующие антитела широкого спектра, упомянутые выше, использовали для проверки правильной укладки вновь созданных молекул и для подтверждения наличия нейтрализующих эпитопов.

Новые полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению демонстрируют увеличенное связывание с антителами, в частности CR6261 и/или CR9114, и/или увеличенную склонность к мульти-

меризации и увеличению стабильности по сравнению со связыванием этих антител со стеблевыми полипептидами, описанными ранее (PCT/EP2012/073706 и PCT/EP2014/060997).

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

Настоящее изобретение, в частности, обеспечивает полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, содержащие:

(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, при этом указанный C-концевой сегмент HA1 соединен с (b) доменом HA2 гемагглютинина вируса гриппа, где домены HA1 и HA2 получены из подтипа вируса гриппа А, содержащего HA подтипа H1;

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

(d) 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, где х = аминокислота в положении 52 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в гемагглютинине другого штамма вируса гриппа), р = аминокислота в положении 18 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в гемагглютинине другого штамма вируса гриппа) и у = аминокислота в положении 321 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентном положении в другом гемагглютинине);

(е) где область, содержащая аминокислотные остатки 402-418, содержит аминокислотную последовательность  $X_1NTQX_2TAX_3GKEX_4N(H/K)X_5E$  (K/R) (SEQ ID NO: 8), где

$X_1$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R и T,

$X_2$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, T, H, L и Y, предпочтительно I, L или Y,

$X_3$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V, A, G, I, R, F и S, предпочтительно A, I или F,

$X_4$  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,

$X_5$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L, H, I, N, R, предпочтительно I;

(f) где аминокислотный остаток в положении 337 (домен HA1) выбран из группы, состоящей из I, E, K, V, A, и T,

аминокислотный остаток в положении 340 (домен HA1) выбран из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y,

аминокислотный остаток в положении 352 (домен HA2) выбран из группы, состоящей из D, V, Y, A, I, N, S, и T, и

аминокислотный остаток в положении 353 (домен HA2) выбран из группы, состоящей из K, R, T, E, G, и V; и

(g) где полипептид дополнительно содержит дисульфидный мостик между аминокислотой в положении 324 и аминокислотой в положении 436; и

(h) где аминокислотная последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20) введена в положения 419-433 или где последовательность RMKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) введена в положения 417-433.

Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает стабильные стеблевые полипептиды гемагглютинина, которые имитируют трехмерную конформацию стебля природной молекулы гемагглютинина.

Полипептиды по настоящему изобретению не содержат полноразмерный домен HA1.

Полипептиды, таким образом, являются существенно меньшими, чем НАО, 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 составляют от приблизительно 250 до приблизительно 350, предпочтительно от приблизительно 260 до приблизительно 340, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330, предпочтительно от приблизительно 270 до приблизительно 330 аминокислот в длину.

Согласно настоящему изобретению "N-концевой сегмент HA1" относится к полипептичному сег-

менту, который соответствует аминоконцевому участку домена HA1 молекулы гемагглютинина (HA) гриппа. N-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты от положения 1 до положения x домена HA1, где аминокислота в положении x представляет собой аминокислотный остаток в пределах HA1. Выражение "С-концевой сегмент HA1" относится к полипептидному сегменту, который соответствует карбоксиконцевому участку домена HA1 гемагглютинина вируса гриппа. С-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты от положения у до С-концевой аминокислоты домена HA1 включительно, где аминокислота в положении у представляет собой аминокислотный остаток в пределах HA1. Согласно настоящему изобретению у больше чем x и ввиду этого сегмент домена HA1 между N-концевым сегментом HA1 и С-концевым сегментом HA1, т.е. между аминокислотой в положении x и аминокислотой в положении у HA1, был подвергнут делеции и в некоторых вариантах осуществления замещен линкерной последовательностью. Таким образом, в определенных вариантах осуществления делеция в сегменте HA1 охватывает аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении x+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-x HA1, где р представляет собой первую аминокислоту зрелой молекулы HA (например, р=18 в случае SEQ ID NO: 1). Специалист в данной области техники сможет определить эквивалентную аминокислоту в других гемагглютининах и получить полипептиды, описанные в настоящем документе, без сигнальных пептидов, например аминокислот 1-17 SEQ ID NO: 1 или эквивалентного положения в других штаммах вируса гриппа H1 (см., например, табл. 2), в положении x домена HA1.

Согласно настоящему изобретению N-концевой сегмент HA1 содержит аминокислоты 1-x, предпочтительно р-x домена HA1, где x=52 и р=18 в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении аминокислоты в других последовательностях HA подтипа H1.

Согласно настоящему изобретению С-концевой полипептидный сегмент HA1 содержит аминокислоты от положения у до С-концевой аминокислоты домена HA1 H1 включительно, где у представляет собой 321 или эквивалентное положение аминокислоты в других последовательностях HA подтипа H1.

Согласно настоящему изобретению N-концевой стеблевой сегмент HA1, таким образом, содержит аминокислотные остатки 1-52 HA1, предпочтительно аминокислотные остатки 18-52 HA1, и С-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 С-концевой стеблевой сегмент HA1 состоит из аминокислотных остатков 321-343 HA1.

Согласно настоящему изобретению полипептиды не содержат участок расщепления протеазами в месте сочленения между доменами HA1 и HA2. Таким образом, полипептиды стеблевого домена гемагглютинина являются устойчивыми к расщеплению протеазой на стыке между HA1 и HA2. Специалистам в данной области техники известно, что последовательность Arg (R) - Gly (G), объединяющая HA1 и HA2 (т.е. положения аминокислот 343 и 344 в SEQ ID NO: 1), 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 участок расщепления протеазами, таким образом, был удален с целью предупреждения расщепления полипептида в участке расщепления между HA1 и HA2 доменом. В определенных вариантах осуществления участок расщепления протеазами был удален посредством мутации С-концевой аминокислоты С-концевого сегмента HA1 и/или мутации N-концевой аминокислоты домена HA2 для получения последовательности, которая является устойчивой к расщеплению протеазой. В определенных вариантах осуществления удаления участка расщепления между HA1 и HA2 в определенных вариантах осуществления можно достичь посредством мутации замены R (в небольшом ряде случаев K) на Q в положении P1 (см., например, Sun et al., 2 010, для пояснения номенклатуры участка расщепления (положение 343 в SEQ ID NO: 1). Таким образом, 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).

Согласно настоящему изобретению полипептиды получены из или лежат в основе HA H1, т.е. HA, содержащем аминокислотную последовательность вируса гриппа подтипа H1. В конкретном варианте осуществления полипептиды содержат стеблевые домены гемагглютинина из или на основе HA вируса гриппа А, включая HA из подтипа H1, например из 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 ге-

магглютинина, которые получены из или лежат в основе HA вируса гриппа А Н1, выбранного из табл. 2. Под выражением "получено из" или "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 встречающегося в природе гемагглютинина вируса гриппа подтипа Н1, известного специалистам в данной области техники или обнаруженного позже.

Согласно настоящему изобретению домен HA2 содержит одну или несколько мутаций в аминокислотной последовательности HA2, соединяющей С-концевой остаток спирали А с N-концевым остатком спирали CD (фиг. 1). Аминокислотная последовательность HA2 Н1, соединяющая С-концевой остаток спирали А 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 С-концевой остаток спирали А с N-концевым остатком CD-спирали, т.е. область, содержащая аминокислотные остатки 402-418 HA вируса гриппа серотипа Н1 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), содержит аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>NTQX<sub>2</sub>TAX<sub>3</sub>GKEX<sub>4</sub>N(H/K)X<sub>5</sub>E (K/R) (SEQ ID NO: 8).

Согласно настоящему изобретению 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<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub>, 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<sub>1</sub>, представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из М, Е, К, V, R и Т.

В определенных вариантах осуществления мутировавшая аминокислота в положении 406, т.е. X<sub>2</sub>, 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<sub>3</sub>, 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<sub>4</sub>, 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<sub>5</sub>, представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L, H, I, N, R, предпочтительно I.

Комбинации этих мутаций также возможны.

В определенных вариантах осуществления X<sub>1</sub> представляет собой М, X<sub>2</sub> представляет собой Y, X<sub>3</sub> представляет собой I, X<sub>4</sub> представляет собой Y, и X<sub>5</sub> 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 HAO (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 мутации, 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 всем документе нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в HAO 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 (или соответствующие) 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 дополнительно содержат 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 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 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.

Заявители ранее выявили нейтрализующие антитела широкого спектра, выделенные из первичных В-клеток человека от вакцинированных индивидуумов, некоторые из них были специфическими для группы 1 (например, CR6261, как описано в WO 2008/028946), а некоторые из них были специфическими для группы 2 вирусов гриппа (например, CR8020, как описано в WO 2010/130636). Подробный анализ эпитопов этих моноклональных антител выявил причину отсутствия перекрестной реактивности этих специфических 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.

По настоящему изобретению предусмотрены полипептиды, которые имитируют специфические эпитопы CR6261 и/или CR9114 и которые могут быть использованы в качестве иммуногенных полипептидов, например, чтобы вызвать перекрестно нейтрализующие антитела при введении *in vivo*, либо отдельно, либо в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими методами лечения. Под "перекрестно нейтрализующими антителами" подразумевают антитела, которые способны нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 1 и/или по меньшей мере два, предпочтительно по

меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 2 и/или по меньшей мере два различных подтипа вирусов гриппа В, в частности по меньшей мере все штаммы вируса, которые нейтрализуются с помощью CR6261 и CR9114.

Полипептиды по настоящему изобретению содержат эпитоп связывающихся со "стеблем" нейтрализующих антител к вирусу гриппа CR6261 и/или CR9114. В определенных вариантах осуществления полипептиды, таким образом, избирательно связываются с антителами CR6261 и/или CR9114. В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению не связываются с антителами CR8020 и/или CR8057. Применяемое в настоящем изобретении 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. 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. 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.

Как описано выше, полипептиды содержат домен HA1 гемагглютинаина вируса гриппа, который содержит N-концевой стеблевой сегмент HA1, ковалентно связанный сшивающей последовательностью из 0-50 аминокислотных остатков с C-концевым стеблевым сегментом HA1. Сшивающая последовательность, если присутствует, не встречается в природном HA или HA дикого типа. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой пептид, который содержит один аминокислотный остаток, два или менее аминокислотных остатка, три или менее аминокислотных остатка, четыре или менее аминокислотных остатка, пять или менее аминокислотных остатков, десять или менее аминокислотных остатков, 15 или менее аминокислотных остатков, или 20 или менее аминокислотных остатков, или 30 или менее аминокислотных остатков, или 40 или менее аминокислотных остатков, или 50 или менее аминокислотных остатков. В конкретном варианте осуществления 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 C-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 были описаны (см., например, Dopheide et al., 2009; Ekiert et al., 2009, 2011; Stevens et al., 2004, 2006; Wilson et al., 1981). Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти способы можно также 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 содержат полный домен HA2, соответственно включающий в себя трансмембранную и внутриклеточную последовательности. В других вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению не содержат внутриклеточные последовательности HA и трансмембранный домен. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат усеченный домен HA2. В определенных 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, 526, 528, 529 или 530 (или эквивалентного ему) домена HA2 до C-конца домена HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), была удалена для получения растворимого полипептида после экспрессии в клетках.

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

Необязательно, последовательность His-метки (НННННН (SEQ ID NO: 15) или НННННННН (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 (НННННН (SEQ ID NO: 15) или ННННННН (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 SGRDYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHNNNNH (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 SGRDYKDDDDKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHNNNNH (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/ЕР2014/060997, 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.

Согласно настоящему изобретению было неожиданно показано, что стабильность и мультимеризованное состояние полипептида зависят от точного местоположения и последовательности для полученной из GCN4 последовательности в первичной последовательности полипептидов по настоящему изобретению.

Таким образом, согласно настоящему изобретению последовательность RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20) введена в положения 419-433 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1) или последовательность RMKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) введена в положения 417-433.

В определенных вариантах осуществления полипептиды являются гликозилированными.

В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, например, 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), s2201C9 (SEQ ID NO: 77), s55G7 (SEQ ID NO: 68), s113E7 (SEQ ID NO: 78), s6E12 (SEQ ID NO: 69), s181H9 (SEQ ID NO: 76), описанные в одновременно находящейся на рассмотрении заявке на патент РСТ/ЕР2014/060997, 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), s2201C9-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 RMKQIEDKIEEIESK (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.

Полипептиды по настоящему изобретению показывают увеличенное связывание антител к вирусу гриппа, в частности CR6261 и/или CR9114, и/или увеличенную склонность к мультимеризации и/или увеличению стабильности, по сравнению со стеблевыми полипептидами, описанными ранее (РСТ/ЕР2012/073706 и РСТ/ЕР2014/060997).

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последова-

тельность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN $X_1$ PSX  
 $_2$ QSQGLFGAIAG $X_3X_4$ EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK $X_5$   
 NTQ $X_6$ TAX $_7$ GKE $X_8$ NK $X_9$ ERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEK  
 VKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKNDCMESCVMKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVSGRDYKDDD  
 DKLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHH (SEQ ID NO: 145),

где  $X_1$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;  
 $X_2$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;  
 $X_3$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;  
 $X_4$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;  
 $X_5$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;  
 $X_6$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;  
 $X_7$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;  
 $X_8$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K,

М и V; и

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN $X_1$ PSX  
 $_2$ QSQGLFGAIAG $X_3X_4$ EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK $X_5$   
 NTQ $X_6$ TAX $_7$ GKE $X_8$ NK $X_9$ ERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEK  
 VKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKNDCMESCVMKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDG (SEQ ID  
 NO: 146),

где  $X_1$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;  
 $X_2$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;  
 $X_3$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;  
 $X_4$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;  
 $X_5$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;  
 $X_6$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;  
 $X_7$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;  
 $X_8$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K,

М и V; и

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRN $X_1$ PSX  
 $_2$ QSQGLFGAIAG $X_3X_4$ EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEK $X_5$   
 NTQ $X_6$ TAX $_7$ GKE $X_8$ NK $X_9$ ERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEK  
 VKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKNDCMESCVMKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ  
 IEG (SEQ ID NO: 147),

где  $X_1$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;  
 $X_2$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;  
 $X_3$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;  
 $X_4$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;  
 $X_5$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;  
 $X_6$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;  
 $X_7$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;  
 $X_8$  представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K,

М и V; и

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRN<sub>1</sub>PSX  
 2QSQGLFGAIAGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>EGGWGTGMVDGWYGYHNNQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKX<sub>5</sub>  
 NTQX<sub>6</sub>TAX<sub>7</sub>GKEX<sub>8</sub>NKX<sub>9</sub>ERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLTDFHDSNVKNLYEK  
 VKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ  
 ILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCNSGLQCRICI (SEQ ID NO: 148),

где X<sub>1</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, I, K, V, A и T;  
 X<sub>2</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, F, N, S и Y;  
 X<sub>3</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из D, F, V, Y, A, I, N, S и T;  
 X<sub>4</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из I, K, R, T, E, G и V;  
 X<sub>5</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, E, K, V, R, T;  
 X<sub>6</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, H и L;  
 X<sub>7</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из A, G, I, R, T, V, F и S;  
 X<sub>8</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, I, N, S, T, Y, G, E, K,

M и V; и

X<sub>9</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из H, I, L, N, R и S.

В определенных вариантах осуществления X<sub>1</sub> представляет собой K, X<sub>2</sub> представляет собой K, X<sub>3</sub> представляет собой F, X<sub>4</sub> представляет собой T, X<sub>5</sub> представляет собой M, X<sub>6</sub> представляет собой Y, X<sub>7</sub> представляет собой I, X<sub>8</sub> представляет собой Y и X<sub>9</sub> представляет собой S в SEQ ID NO: 145-148.

Полипептиды стеблевого домена гемагглютинаина 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-Нуг 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 искусст-

венным 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 et al., 1985), и т.п. Из эукариотических клеток также можно получить подходящие промоторы, такие как промоторы генов металлотионеинов (MT), промотор гена фактора элонгации 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) (Gill et al., 2001), промотор гена убиквитина C или UB6 (Gill et al., 2001), промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов теплового шока и т.п. 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, но без ограничения, his-, msc-, strep- или flag-метка) или полного белка (такого как, например, но без ограничения, мальтозу связывающий белок или глутатион-S-трансфераза) можно добавить к последовательностям по настоящему изобретению для обеспечения очистки и/или идентификации полипептидов из клеток или супернатанта. Необязательно 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 иммуногенным композициям, содержащим терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из полипептидов и/или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Иммуногенные 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, 18<sup>th</sup> 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, 3<sup>rd</sup> 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 HA гриппа, молекулам нуклеиновых кислот и/или векторам, описанным выше, для применения в индукции иммунного ответа против белка HA 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 Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н7 и/или Н10, 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 Н1, 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 Н1.

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 определенных 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 сапонина, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002 620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацелированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотив, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT E. coli, холерный токсин СТ, коклюшный токсин РТ или столбнячный анатоксин ТТ, Matrix М (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, гСТВ, бактериальными флагеллинами или другими), или включение полипептидов в виросомы, или их комбинации. Другими неограничивающими примерами, которые можно применять, являются, например, раскрытые Coffman et al.(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 специалистам в данной области техники.

В конкретном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению включен в виросому. Виросому, содержащую полипептид согласно настоящему изобретению, можно получить с помощью методик, известных специалисту в данной области техники. Например, виросому 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 индуцирования иммунного ответа у субъекта против гриппа НА, в частности, для применения в качестве вакцины. Полипептиды стеблевого домена гемагглютинина вируса гриппа, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды, или векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты или полипептиды, описанные в настоящем документе, таким образом, можно 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 Н1.

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 и/или иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению можно выполнить с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие примеры включают в себя парентеральное введение, такое как внутривенное, внутрискожное, 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 композицию (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 и/или иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят только один раз.

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

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы предупреждения и/или лечения заболеваний, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или композиций, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления способ профилактики и/или лечения заболевания вирусом гриппа у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептида, нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции, как описано выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, нуклеиновой кислоты и/или композиции, 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. 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, нуклеиновые кислоты и/или композиции по настоящему изобретению, таким образом, можно ввести "наивному" субъекту, т.е. субъекту, который не страдает заболеванием, вызванным инфекцией вируса гриппа, или не был и в настоящее время не инфицирован 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  $\geq 50$  лет, в возрасте  $\geq 60$  лет и предпочтительно в возрасте  $\geq 65$  лет), молодых (например, в возрасте  $\leq 5$  лет, в возрасте  $\leq 1$  года), госпи-

тализованных пациентов и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но продемонстрировали неудовлетворительный противовирусный ответ.

В другом варианте осуществления полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или иммуногенные композиции 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 ею, 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 фигурами. Примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

### Примеры

Пример 1. Стеблевые полипептиды, как описано в РСТ/EP2014/060997.

В РСТ/EP2012/073706 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/EP2014/060997 раскрыты дополнительные последовательности полипептидов стеблевого домена, полученных из полноразмерного НА 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 также стабильно представляли эпитоп нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR6261 (Throsby et al., 2009; Ekiert et al., 2010) и/или CR9114.

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

(1) Удаление участка расщепления в НАО. Расщепление НА дикого типа в данном участке приводит к образованию НА1 и НА2. Удаления можно достичь посредством мутации замены R на Q в положении P1 (см., например, Sun et al., 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 A-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 НА. 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 С-конца HA2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), так что после экспрессии в клетках продуцировался секретируемый (растворимый) полипептид. Растворимый полипептид дополнительно стабилизировали путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. последовательности фолдона GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 3), не обязательно 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 (НННННН (SEQ ID NO: 15) или ННННННН (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, 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 РСТ/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 HA, 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) создавали.

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 HA (остатки 1-17 в SEQ ID NO: 1 и 2), тогда как в конструкциях, применяемых для экспрессии в *P. pastoris*, лидерная последовательность HA 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 изобре-

тению. Все последовательности содержали С-концевую последовательность FLAG-foldon-HIS (SEQ ID NO: 4).

Связывание моноклональных антител (CR6261, CR9114, CR8020) с полипептидами 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 мМ 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 полипептиды характеризуются более высоким соотношением сигнала связывания с CR6261 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 определение характеристик полипептидов по настоящему изобретению.

Полипептиды по настоящему изобретению содержат последовательность `RMKQIEDKIEEIESK` (SEQ ID NO: 20) или `RMKQIEDKIEEIESKQK` (SEQ ID NO: 21), 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. Согласно настоящему изобретению было неожиданно обнаружено, что стабильность и агрегированное состояние полипептидов по настоящему изобретению зависят от точного местоположения и последовательности для полученной из GCN4 последовательности в первичной последовательности полипептидов по настоящему изобретению.

Таким образом, в данном примере авторы настоящего изобретения описывают новый набор полипептидов по настоящему изобретению, 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 RМKQIEDKIEEIESK (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 RМKQIEDKIEEIESKQK (SEQ ID NO: 21) в положениях 417-433.

Полипептиды по настоящему изобретению можно создать на основе последовательности молекул HA различных штаммов вирусов. SEQ ID NO: 149-155, например, описаны полипептиды по настоящему изобретению на основе последовательности HA штамма H1N1 A/California/07/09.

Как описано ранее, растворимые полипептиды по настоящему изобретению можно создать путем удаления С-концевой части последовательностей на основе HA, например, от остатка 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 526, 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 присоединенной 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: 16) или НННННН (SEQ ID NO: 15)) 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.

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 RSLVPRGSPGННННННН, содержащей как модифицированный участок расщепления тромбином, так и 6-гистидиновую метку (SEQ ID NO: 15), 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).

Собирали культуральную среду, и выявляли связывание с CR6261, CR9114 посредством сэндвич-ELISA с применением покрывающего mAb CR6261 или CR9114 для захвата полипептида по настоящему изобретению 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 по настоящему изобретению применяли биотинилированное CR9114 в комбинации со стрептавидином, конъюгированным с HRP. Данный формат обеспечивает возможность выявления наличия мультимерных форм полипептидов по настоящему изобретению. Все тестируемые полипептиды по настоящему изобретению были способны к связыванию с CR9114 (фиг. 2A и 2B, фиг. 3A и 3B и фиг. 4A и 4B) и CR6261 (фиг. 2C и 2D, фиг. 3C и 3D, фиг. 4C и 4D), как определено 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), как показано на фиг. 2E и 2F, 3E и 3F и 4E и 4F.

С целью получения препаратов полипептидов по настоящему изобретению высокой степени чистоты для определения 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 получения полипептидов по настоящему изобретению  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл высевали путем осаждения клеток HEK293F (Invitrogen) при 300g 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% CO<sub>2</sub> при 110 об/мин в инкубаторе Multitron. Через 1 ч плазмидную ДНК отмеривали пипеткой в 9,9 мл среды Opti-mem до концентрации 1,0 мкг/мл в 300 мл объема культуры. Параллельно 440 мкл 293fectin® отмеривали пипеткой в 9,9 мл среды Opti-mem и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Че-

рез 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% CO<sub>2</sub> и 110 об/мин в инкубаторе Multitron. В день 7 клетки отделяли от культуральной среды путем центрифугирования (30 мин при 3000g), при этом надосадочную жидкость, содержащую растворимые полипептиды по настоящему изобретению, 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 этапа промывки с 10 mM имидазола в промывочном буфере связанные полипептиды по настоящему изобретению элюировали ступенчатым градиентом 300 mM имидазола в промывочном буфере. Пики элюента собирали, концентрировали и вносили в колонку для эксклюзионной хроматографии для дополнительной очистки (Superdex 200). Профили элюирования показаны на фиг. 5. Фракции 55G7-t2 и 127H1-t2 собирали, объединяли, как указано на фигуре, и анализировали с помощью SDS-PAGE (фиг. 6), ELISA и аналитической эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) для оценивания молекулярной массы. Результаты ELISA подтвердили связывание полипептидов по настоящему изобретению с CR6261 и CR9114, но не с CR8020. Результаты SEC-MALS обобщены в табл. 8.

На фиг. 5 и в табл. 8 указано, что полипептид s127H1-t2 по настоящему изобретению характеризуется более высоким выходом (~30 мг белка/л надосадочной жидкости культуры) по сравнению с s55G7-t2 и s86B4-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 показаны на фиг. 7 и обобщены в табл. 8.

Результаты демонстрируют, что растворимая форма полипептида s127H1-t2 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, полученными из группы 1, тогда как CR8020 - нет. Размер комплекса приведен в табл. 8, и это 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 по настоящему изобретению находится в димерной форме.

Для дополнительного анализа реакции связывания между полипептидом 127H1-t2 по настоящему изобретению 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 Red<sup>384</sup>, Forte Bio). Для этого биотинилированные CR6261, CR9114 и CR8020 иммобилизовали на покрытых стрептавидином сенсорах, которые впоследствии подвергали воздействию сначала раствора очищенного полипептида по настоящему изобретению для измерения скорости ассоциации, а затем промывочного раствора для измерения скорости диссоциации. Результаты показаны на фиг. 8.

Оба иммобилизованных CR6261 и CR9114 распознают полипептид по настоящему изобретению, о чем свидетельствуют четкие ответы после воздействия растворимой формы 127H1-t2 (фиг. 8). 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 в концентрациях 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,3 и 0,63 нМ соответственно, и регистрировали конечный ответ через 6600 с. Ответы откладывали на графике в зависимости от концентрации полипептида стеблевого домена, и проводили аппроксимацию 1:1 к модели связывания в стационарном состоянии, получая константу диссоциации K<sub>d</sub> 3,5 нМ для комплекса CR6261/полипептид стеблевого домена и 2,3 нМ для комплекса с CR9114 (фиг. 8).

В заключение полипептид s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) 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. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению в модели летального контрольного заражения гриппом.

С целью оценки профилактической эффективности полипептидов s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) на модели летального контрольного заражения гриппом группы из 10 самок мышей BALB/c (возрастом 6-8 недель) иммунизировали 3 раза с 3-недельными интервалами 10 мкг очищенного s127H1-t2 как без добавления вспомогательного средства, так и усиленного 10 мкг Matrix-M. В качестве положительного контроля для модели контрольного заражения i.m. вводили нейтрализующее антитело широкого спектра - моноклональное антитело CR6261 (15 мг/кг) за 1 день до контрольного за-

ражения, тогда как иммунизация с PBS служила в качестве отрицательного контроля. Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению  $25 \times LD_{50}$  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 тестировали в анализах ELISA на связывание с полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению, который применяли для иммунизации (для проверки правильности иммунизации), на связывание с растворимым полноразмерным HA H1N1 A/Brisbane/59/07 (для проверки распознавания полноразмерного HA) и на конкуренцию с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, моноклональным антителом CR9114, за связывание с полноразмерным HA (для определения того, связываются ли индуцированные антитела в непосредственной близости с эпитопом нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114). Результаты показаны на фиг. 9-12.

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. 9). В отличие от мышей, обработанных PBS, 3 из 10 мышей, иммунизированных не усиленным полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) и 10 из 10 мышей, иммунизированных усиленным полипептидом по настоящему изобретению, выживают после летального контрольного заражения (см. фиг. 10). По сравнению с контрольной группой с PBS для групп, иммунизированных полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению, наблюдается увеличение доли выживших, увеличение продолжительности выживания и снижение клинического показателя. Различия являются наиболее выраженными для группы, получающей полипептид по настоящему изобретению с добавленным вспомогательным средством, но они также наблюдаются для группы, получающей полипептид без добавленного вспомогательного средства.

Данные ELISA с применением s127H1-t2 или растворимого полноразмерного HA в качестве антигена указывают, что полипептид s127H1 по настоящему изобретению является иммуногенным и индуцирует антитела, которые способны распознавать полноразмерный HA, независимо от применения вспомогательного средства (фиг. 11A и 11B).

Для более глубокого понимания иммунологического ответа на иммунизацию проводили ELISA с конкурентным связыванием. С этой целью планшет, связывающий полноразмерный HA, инкубируют с образцами сыворотки крови в серийном разведении, после чего добавляют CR9114-биотин в заранее определенной титрованной концентрации. После дополнительной инкубации оценивают количество связанного CR9114-биотина с использованием конъюгированной со стрептавидином пероксидазы хрена согласно протоколам, хорошо известным в уровне техники. Данные анализируют с использованием линейной регрессии OD против log разведения, выраженного как "наклон OD" (AOD/10-кратное разведение). Данные показывают, что выявляемые уровни антител, которые способны конкурировать за связывание с нейтрализующим антителом широкого спектра действия CR9114, индуцируются путем иммунизации усиленными полипептидами по настоящему изобретению, на что указывают повышенные уровни конкуренции, наблюдаемые на фиг. 12A. Для сравнения уровни конкуренции с меченым CR9114 (т.е. самоконкуренция) и несвязывающими моноклональными антителами CR8020 и CR-JB, оба в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл, показаны на отдельном графике.

В заключение авторы настоящего изобретения показали, что иммунизация полипептидами s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) может защищать мышей от летального инфицирования гриппом. Полипептид является иммуногенным и индуцирует выработку антител, которые могут связываться с полноразмерным HA. Если полипептид по настоящему изобретению применяют комбинации со вспомогательным средством, то по меньшей мере часть выявляемых индуцированных антител связывается с эпитопом, который представляет собой эпитоп нейтрализующего моноклонального антитела широкого спектра действия CR9114, или рядом с ним.

Пример 4. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению в модели летального контрольного заражения гриппом.

С целью дополнительной оценки профилактической эффективности полипептидов s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) в модели летального контрольного заражения гриппом группы из 10 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 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  $25 \times LD_{50}$  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 по настоящему изобретению, который применяли для

иммунизации (для проверки правильности иммунизации), на связывание с растворимым полноразмерным HA H1N1 A/Brisbane/59/07 (для проверки распознавания полноразмерного HA) и на конкуренцию с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, моноклональным антителом CR9114, за связывание с полноразмерным HA (для определения того, связываются ли индуцированные антитела в непосредственной близости с эпитопом нейтрализующего антитела широкого спектра действия CR9114). Результаты показаны на фиг. 13-18.

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) была полностью защищена (фиг. 13A). Все мыши, однократно иммунизированные s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91), погибают от инфекции между днем 7 и 9 (фиг. 14A). В противоположность этому, после двух иммунизаций 8 из 10 мышей выживали и после 3 иммунизаций все мыши (10 из 10) выживали после летального контрольного заражения (фиг. 14B, 14C). Также снижалась потеря веса тела у групп, многократно иммунизированных, с наиболее низкими процентными значениями, которые наблюдали для иммунизированных три раза животных (фиг. 15B, 15C). По сравнению с контрольной группой с PBS, для групп, иммунизированных два или три раза полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению, наблюдается статистически значимое увеличение доли выживших, увеличение продолжительности выживания, снижение потери веса тела и снижение клинического показателя (см. фиг. 16B, 16C).

Данные ELISA в моменты времени до контрольного заражения через 4 недели после заключительной иммунизации с применением s127H1-t2 (фиг. 17A) или растворимого полноразмерного HA (фиг. 17B) в качестве антигена указывают на то, что полипептид S127H1 по настоящему изобретению является иммуногенным и индуцирует выработку антител, которые способны к распознаванию полноразмерного HA даже после одной иммунизации, хотя уровни являются значимо более высокими после двух и трех иммунизаций. С применением анализа конкурентного связывания CR9114, описанного выше, выявляемые уровни антител, которые способны конкурировать за связывание с нейтрализующим антителом широкого спектра действия CR9114, были индуцированы после двух и трех иммунизаций полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) (фиг. 18A). Для сравнения уровни конкуренции с немеченым CR9114 (т.е. самоконкуренция) и несвязывающими моноклональными антителами CR8020 и CR-JB, оба в серийном разведении из исходной концентрации 5 мкг/мл, показаны на отдельном графике (фиг. 18B).

В заключение авторы настоящего изобретения показали, что иммунизация два и три раза полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) может защищать мышей от летального инфицирования гриппом. Полипептид является иммуногенным и индуцирует выработку антител, которые могут связываться с полноразмерным HA. 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 5. Оценка профилактической эффективности полипептида по настоящему изобретению в модели летального контрольного заражения гетеросубтипическим вирусом гриппа H5N1.

С целью дополнительной оценки профилактической эффективности полипептидов s127H1-t2- по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) 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 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 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. 19A). Восемь из 10 (80%) мышей, иммунизированных s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91), выживают после летального контрольного заражения (фиг. 19B). Средняя потеря веса тела составляет примерно 15% в день 9, но при этом выжившие животные восстанавливают и набирают вес тела (фиг. 19C). Медианный клинический показатель составляет 1,5 в дни 3-6, но начиная от дня 8 и далее у выживших мышей не наблюдали никаких клинических симптомов (фиг. 19D). По сравнению с контрольной группой с PBS для группы, иммунизированной полипептидом s127H1-t2 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-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) может защищать мышей от летального инфицирования гетеросубтипическим штаммом H5N1 вируса гриппа.

Пример 6. Оценка широты спектра связывания для сывороточных антител, выработка которых вызывается посредством иммунизации полипептидом по настоящему изобретению.

Образцы сыворотки крови до контрольного заражения от мышей, иммунизированных 3 раза согласно описанному в примере 5, также тестировали на связывание с полноразмерными HA ряда других штаммов вируса гриппа из группы 1 (H1, H5 и H9) и группы 2 (H3 и H7) посредством ELISA, следуя протоколам, хорошо известным из уровня техники (фиг. 20). Результаты демонстрируют, что антитела, индуцированные полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91), 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 1, включая HA H1, H5 и H9.

Пример 7. 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 s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91) 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 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×LD<sub>50</sub> 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. 21A). 10 из 10 мышей, иммунизированных s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91), выживают после летального контрольного заражения (фиг. 21B). В дополнение, потеря веса тела через 5 дней после инфицирования составляет в среднем приблизительно 20% (фиг. 21C), однако в течение 21-дневного периода последующего наблюдения животные полностью восстанавливаются. Медианные клинические показатели достигают пика со значением 3 через 2-9 дней после инфицирования, но возвращаются на исходный уровень (0), начиная с дня 16 после инфицирования (фиг. 21D). По сравнению с контрольной группой с PBS, для группы, иммунизированной полипептидом s127H1-t2 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-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) может защищать мышей от летального инфицирования H1N1 A/Brisbane/59/2007.

Пример 8. Оценка наличия нейтрализующих антител к вирусу гриппа в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению.

Для дополнительного исследования антитело-опосредованных эффекторных механизмов, играющих роль в защите от гриппа, образцы сыворотки крови до контрольного заражения тестировали в анализе нейтрализации псевдочастиц (Alberini et al., 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 et al., 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 et al., 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 подобранный количество псевдочастиц H5 A/Vietnam/1194/04 (с получением 10<sup>6</sup> относительных единиц люминесценции (RLU) после инфицирования). Спустя 1 ч инкубирования при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> добавляли 10<sup>4</sup> клеток HEK293 на лунку. Спустя 48 ч инкубирования при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> добавляли субстрат для люциферазы (Britelite Plus, Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс), и с помощью люминометра (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Германия) измеряли люминесценцию согласно инструкциям производителя.

Образцы сыворотки крови до контрольного заражения, полученные от животных, иммунизированных полипептидом s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) согласно описанному в примерах 5-7, демонстрировали выявляемую нейтрализацию при высоких сывороточных концентрациях при применении анализа нейтрализации псевдочастиц (фиг. 22). Это демонстрирует способность полипепти-

да 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 et al., 2014). С целью тестирования того, были ли антитела, выработка которых вызывается после иммунизации полипептидом s127H1-t21181long по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 186), способными индуцировать ADCC, авторы настоящего изобретения тестировали образцы сыворотки крови с применением анализа ADCC в модели (Parekh et al., 2012; Schneuriger et al., 2012; Cheng et al., 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), выдерживали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM), дополненной 10% термоинактивированной фетальной телячьей сывороткой крови, при 37°C, 10% CO<sub>2</sub>. 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 часов 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-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) согласно описанному в примерах 5-7, 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. 23). В обоих случаях наблюдается 30-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 5-8, демонстрируют способность полипептида s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) 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 9. Защита от летального контрольного заражения H5N1 A/Нопд Копд/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. Целью данного исследования было определение того, придает ли пассивное переливание (многократное дозирование) сыворотки крови от мышей, иммунизированных три раза s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91) и s127H1-t2long (SEQ ID NO: 101), содержащими дополнительную His-метку в присутствии вспомогательного средства (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 (SEQ ID NO: 91), s127H1-t2long (SEQ ID NO: 101), содержащими C-концевую His-метку, с 10 мкг добавленного в качестве вспомогательного средства Matrix-M или 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 мышам 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 у мышам-доноров и оп-

ределения 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.

Контрольное заражение.

Эксперимент являлся 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 полипептидом по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M, SEQ ID NO: 91, ранее не участвовавшим в эксперименте мышам-реципиентам приводят к значимому увеличению продолжительности выживания ( $p = 0,007$ ) и снижению клинических показателей ( $p = 0,012$ ), по сравнению с контрольной группой с PBS для переливания сыворотки крови (фиг. 24).

Три переливания сыворотки крови от мышей, иммунизированных полипептидом по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M, SEQ ID NO: 101, ранее не участвовавшим в эксперименте мышам-реципиентам приводят к значимому увеличению доли выживших ( $p = 0,002$ ), увеличению продолжительности выживания ( $p < 0,001$ ), уменьшению потери веса тела ( $p = 0,002$ ) и снижению клинических показателей ( $p < 0,001$ ), по сравнению с контрольной группой с PBS для переливания сыворотки крови, (фиг. 24)

У полипептидов по настоящему изобретению исследуемые титры антител, специфичных к FL HA A/Brisbane/59/07, после трех переливаний сыворотки крови были сходны с уровнями, полученными после активной иммунизации (фиг. 25).

Вывод.

Компоненты сыворотки крови (наиболее вероятно, антитела), индуцируемые 3-кратной иммунизацией полипептидами по настоящему изобретению SEQ ID NO: 91 и 101 с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M могут защитить мышей от летального контрольного заражения с H5N1 A/Hong Kong/156/97 (процентные значения выживаемости составляют 30 и 78% соответственно).

Пример 10. Профилактическая эффективность полипептидов по настоящему изобретению *in vivo* в модели контрольного заражения мышей H1N1 A/NL/602/09.

Определяли профилактическую эффективность полипептидов s127H1-t2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 91) и S127H1-t2long (SEQ ID NO: 101), содержащих дополнительную His-метку с 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 полипептидов по настоящему изобретению с 10 мкг 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 ( $n = 18$ ). 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) тестировали в анализах ELISA на связывание с FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли индуцированные антитела в непосредственной близости с эпитопом для CR9114, проводили конкурентный ELISA с применением CR9114. Данные о конкуренции выражали с применением наклона OD, с помощью которого можно количественно оценить ответы.

Результаты.

Эксперимент является достоверным; все мыши в контрольной группе с PBS погибают от инфекции в день 8 после контрольного заражения или до него (медианное значение 5 дней), тогда как группа положительного контроля (15 мг/кг CR6261, за 1 день до контрольного заражения) полностью защищена ( $p < 0,001$ ).

Три иммунизации s127H1-t2 с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 91) и s127H1-t2long (SEQ ID NO: 101), содержащим дополнительную His-метку, приводят к значимому увеличению доли выживших ( $p < 0,001$ ), увеличению продолжительности выживания ( $p < 0,001$ ) и снижению клинических показателей ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой с PBS (фиг. 26).

Три иммунизации варианта mini-HA H1 s127H1-t2 с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 91) приводят к значимому уменьшению веса тела ( $p < 0,001$ ) по сравне-

нию с контрольной группой с PBS (фиг. 26).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных полипептидами по настоящему изобретению, являются значимо более высокими по сравнению с PBS для всех тестируемых вариантов mini-НА H1 ( $p < 0,001$ ) (фиг. 27A).

Вариант mini-НА H1 s127H1-t2 (SEQ ID NO: 91) характеризовался значимо более высокими титрами антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 по сравнению с s127H1-t2long (SEQ ID NO: 101), содержащим дополнительную His-метку ( $p = 0,021$ ) (фиг. 27A).

Все тестируемые полипептиды по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M характеризовались значимо более высокими титрами антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ( $p < 0,001$ ) (фиг. 27B).

Вывод.

Полипептиды s127H1-t2 по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 91) и s127H1-t2long (SEQ ID NO: 101), содержащие дополнительную His-метку, придают защиту от летального контрольного заражения H1N1 A/NL/602/09, которая проявляется в увеличении доли выживших, продолжительности выживания и снижении клинических показателей. Кроме того, s127H1-t2 с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 91), также приводил к снижению потери веса тела после летального контрольного заражения H1N1 A/NL/602/09.

Пример 11. Скрининг библиотеки.

В PCT/EP2012/073706 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 настоящем документе мы описываем дополнительные последовательности полипептидов стеблевого домена, полученные из полноразмерного НА из H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1). Полипептиды стеблевого домена получают путем сайт-направленной мутации в H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2 (SEQ ID NO: 52) и представляют нейтрализующий эпитоп гриппа широкого спектра для CR6261 (Throsby et al., 2009; Ekiert et al. 2010) и/или CR9114.

H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2 (SEQ ID NO: 52) был получен из полноразмерного НА H1N1 A/Brisbane/59/2007 (SEQ ID NO: 1) посредством осуществления следующих стадий.

Удаление участка расщепления в НАО. Расщепление НА дикого типа в данном участке приводит к образованию НА1 и НА2. Удаления можно достичь посредством мутации замены R на Q в положении P1 (см., например, Sun et al., 2010 для пояснения номенклатуры участка расщепления (положение 343 в SEQ ID NO: 1).

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.

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 НА. 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).

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).

Введение полученной из GCN4 последовательности RMKQIEDKIEEIESK (SEQ ID NO: 20), которая известна как тримеризующая, в положения 419-433 (нумерация относится к SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат внутриклеточные последовательности НА и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления последовательность трансмембранного и внутриклеточного домена была удалена от положения (или эквивалентного ему, как определено по выравниванию последовательности) 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 526, 527, 528, 529 или 530 из НА2 до С-конца НА2 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1), так что секретируемый (растворимый) полипептид получают после экспрессии в клетках. Растворимый полипептид можно дополнительно стабилизировать путем введения последовательности, которая, как известно, образует тримерные структуры, т.е. последовательность-фолдон AYVRKDGWVLL (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 (NNNNNN (SEQ ID NO: 16) или NNNNNN (SEQ ID NO: 15, 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-GCN4t2 (SEQ ID NO: 51) для создания исходной последовательности (SEQ ID NO: 156), 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 создают посредством делеции части последовательности гемагглютинина, которая кодирует головной домен молекулы, и повторного соединения N- и С-концевых частей последовательности по обе стороны от делеции посредством линкера, как описано в PCT/2012/073706 и выше. 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: 156 в качестве исходной точки. SEQ ID NO: 156 создавали из H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2 (SEQ ID NO: 52) путем удаления лидерной последовательности и замещения остатков 520-565 последовательностью FLAG-thrombin-foldon-His (SEQ ID NO: 4).

Аналогичным образом, в области вокруг гибридного пептида ряд гидрофобных остатков открывают для растворителя, что обусловлено тем фактом, что в отличие от нативного полноразмерного HA полипептиды по настоящему изобретению не могут быть расщеплены и проходят ассоциированное конформационное изменение, которое погружает гидрофобный гибридный пептид во внутреннюю часть белка. Чтобы решить эту проблему, некоторые или все из остатков I337, I340, F352 и I353 в SEQ ID NO: 156 также подвергали мутации.

Два различных набора мутантных полипептидов раскрыты в табл. 9. Во всех случаях данные полипептиды содержат SEQ ID NO: 20 в положениях 419-433 (нумерация согласно SEQ ID NO: 1).

Пример 12 Идентификация, очистка и определение характеристик тримерных полипептидов по настоящему изобретению.

Были созданы библиотеки полипептидов, как описано в примере 11 (набор 1 и набор 2), содержащие SEQ ID NO: 20 в положениях 419-433. Независимо трансфицировали отдельные клоны в клетки HEK2 93F и скрининговую культуральную среду для мультимеров (сэндвич-ELISA с применением CR9114), связывания с CR6261 (ELISA) и экспрессии белка (анализ HTRF). Хиты на основе сэндвич-ELISA с применением CR9114, ELISA и анализа HTRF в отношении CR9114, CR6261 и CR8020, подтверждали и им давали оценку.

Оценивали мультимеризацию посредством перекрестного сшивания с первичным амином (присутствует в остатках лизина), специфическим кросслинкером BS3 с последующим SDS-PAGE (см. ниже). По причине обширной мультимеризации С-концевую последовательность метки Flag-foldon-His (FFH) замещали участком расщепления тромбином и последовательностью His-метки (TCSHis). Как следствие, мультимеризация, содержащая последовательности TCS-His (сэндвич-анализ CR9114, перекрестное сшивание BS3), была повторно подтверждена, и клонам давали оценку и отбирали. Выбранные клоны экспрессировали, очищали и охарактеризовывали.

Исследования перекрестного сшивания проводили следующим образом.

Добавляли кросслинкер BS3 (бис-(сульфосукцинимидил)суберат) непосредственно в культуральную среду.

Инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Собирали среду и анализировали с помощью SDS-PAGE/вестерн-блоттинга в восстанавливающих (R, 5 mM DTT) и в невосстанавливающих (NR) условиях.

В восстанавливающих условиях только перекрестно сшитые с BS3 образцы остались ковалентно соединенными.

Выявление mini-HA посредством вестерн-блоттинга с применением His-метки специфического mAb.

Результаты.

1. Были успешно созданы две библиотеки с высоким качеством (точные на >90% в отношении ORF), включающие SEQ ID NO: 20 в положениях 419-433 и ожидаемые изменения в последовательности (>97% рандомизации).

2. Все 10472 клон (5544 и 4928 из набора 1 и 2 соответственно) оценивали в первичном скрининге (фиг. 28).

3. Клонов, характеризующихся экспрессией FL HA при уровне экспрессии >50% и сигналами свя-

зывания с CR6261 при уровне >80% сигналов, наблюдаемых в случае использования FL HA, считали хитами; при этом данная процедура давала 703 хитов (596 и 107 из библиотек 1 и 2, соответственно).

4. 658 из 703 хитов сохранились после подтверждающего скрининга.

5. Исследование перекрестного сшивания 20% наилучших хитов (111) показало наличие мультимеров более высокого порядка, что может потенциально препятствовать очистке тримерных образцов.

6. 20% наилучших подтвержденных хитов (111) были успешно клонированы для замещения FFH С-конца последовательностью TCS-His, с последующим сэндвич-ELISA с применением CR9114 и оценкой исследования перекрестного сшивания.

7. Исследования перекрестного сшивания выдали 9 клонов, которые считали наиболее перспективными тримерами-кандидатами (SEQ ID NO: 158-166, табл. 11). Основываясь на сэндвич-ELISA с применением CR9114 (фиг. 29), три кандидата (2 с TCS-His, 1 с FFH С-концом) отбирали для экспрессии и очистки.

8. Два из выбранных кандидатов экспрессировались плохо, и очистку не предпринимали. Последовательность-кандидат GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) очищали до гомогенности (7,6 мг от общего белка; чистота >95%, HP-SEC), следуя процедурам, описанным в примере 4.

9. Определение характеристик GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) посредством анализа SEC-MALS указывает на образование тримера в растворе, со связыванием 3 Fab-фрагментов CR9114 или CR6261 связывания на тример (фиг. 30 и табл. 10).  $K_d^{app}$ , как определено из измерений бислойной интерферометрии (Octet), составляет 1 нМ для каждого из CR6261 и CR9114. Как и ожидалось, связывание CR8020 (отрицательный контроль) невозможно определить каким-либо способом.

Вывод.

Идентифицировали нековалентный тримерный полипептид по настоящему изобретению (GW1.5E2.FFH, SEQ ID NO: 158), который связывает bnAbs CR6261 и CR9114 с высокой аффинностью со стехиометрическим соотношением 3:1.

Пример 13. Профилактическая эффективность полипептида mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) в мышинной модели заражения H1N1 A/Brisbane/59/07.

Определяли профилактическую эффективность mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) с добавленным в качестве вспомогательного средства 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 mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) 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 mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестировали в анализах ELISA на связывание с FL HA из H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли антитела, индуцированные полипептидом mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158), 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.

Эксперимент являлся 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 mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводили к значимому увеличению доли выживших (p<0,001), увеличению продолжительности выживания (p<0,001), уменьшению потери веса тела (p<0,001) и снижению клинических показателей (p<0,001) по сравнению с контрольной группой с PBS (фиг. 31).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных mini-HA sH1 GW1.5E2.FFH (SEQ ID NO: 158) до контрольного заражения, являются значимо более высокими по сравнению с PBS (p<0,001) (фиг. 32A).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07 выходят на плато после двух иммунизаций (не показано).

Полипептид mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 158) индуцирует значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ( $p < 0,001$ ) (фиг. 32B).

Вывод.

Полипептид mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 158) придает защиту от летального контрольного заражения H1N1 A/Brisbane/59/07.

Пример 14. Профилактическая эффективность полипептида mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) в мышинной модели заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97.

Определяли профилактическую эффективность главных вариантов mini-NA H1 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 mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) 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 полипептида mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестировали в анализах ELISA на связывание с FL HA из H1N1 A/Brisbane/59/07. Для определения того, связываются ли антитела, индуцированные mini-NA, 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 Эксперимент являлся 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 полипептидом mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводили к значимому увеличению доли выживших ( $p < 0,001$ ), увеличению продолжительности выживания ( $p < 0,001$ ), уменьшению потери веса тела ( $p < 0,001$ ) и снижению клинических показателей ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой с PBS (фиг. 33).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных полипептидом mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) до контрольного заражения, являются значимо более высокими по сравнению с PBS ( $p < 0,001$ ) (фиг. 34A).

Полипептид mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 158) индуцирует значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS ( $p < 0,001$ ) (фиг. 34B).

Вывод Полипептид mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 158) придает гетеросубтипическую защиту от летального контрольного заражения H5N1 A/Hong Kong/156/97.

Пример 15. Профилактическая эффективность полипептида mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) в мышинной модели заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34.

Определяли профилактическую эффективность полипептида mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) 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 полипептида mini-NA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) 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 полипептида mini-HA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) образцы сыворотки крови до контрольного заражения (день -1) тестировали в анализе ELISA на связывание с FL HA из 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.

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 полипептидом mini-HA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158) с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M приводил к значимому увеличению доли выживших (p<0,001), увеличению продолжительности выживания (p<0,001), уменьшению потери веса тела (p<0,001) и снижению клинических показателей (p<0,001) по сравнению с контрольной группой с PBS (фиг. 35).

Титры антител IgG к FL HA H1N1 A/Brisbane/59/07, индуцированных полипептидом mini-HA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 158), являются значимо более высокими по сравнению с PBS (p<0,001) (фиг. 36A).

Полипептид mini-HA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 158) индуцирует значимо более высокие титры антител, конкурирующих с CR9114, по сравнению с PBS (p<0,001) (фиг. 36B).

#### Вывод.

Полипептид mini-HA sH1 GW1.5E2-FFH по настоящему изобретению с добавленным в качестве вспомогательного средства Matrix-M (SEQ ID NO: 158) придает защиту от летального контрольного заражения H1N1 A/Puerto Rico/8/34.

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

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. MEAKLFLFC AFTALKADTF CVGYHANYST HTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
ENSHNGKLCS 60
  6. MEAKLFLFC AFTALKADTI CVGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSINLL  
ENNHNGKLCS 60
  7. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCL 60

8. MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCL 60

9. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

10. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

11. MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCL 60

12. MKAKLLVLLC AFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

13. MKAKLLVLLC AFTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

14. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDNHNGKLCK 60

15. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

16. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

17. MKAKLLVLLC ALSATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

18. MKAKLLVLLC AFTATDADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

19. 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 DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
EDSHNGKLCR 60

038400

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 NPENGTCPYGP  
HFADYEELRE 120

2. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP NPENGTCPYGP  
HFADYEELRE 120

3. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCPYGP  
YFADYEELRE 120

4. LRGVAPLHLG KCNIAGWILG NPECESLSTA SWSYIVETP SSDNGTCYGP  
DFIDYEELRE 120

5. LNGKIPLQLG NCSVAGWILG NPKCDLLTA NSSYIIETS KSKNGACYPG  
EFADYEELKE 120

6. LNGKAPLQLG NCSVAGWILG NPECDLLTV DSWYIIETS NSKNGACYPG  
EFADYEELRE 120

7. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCPYGP  
YFADYEELRE 120

8. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISR ESWSYIVEKP NPENGTCPYGP  
HFADYEELRE 120

9. LKGTAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP NPKNGTCYGP  
YFADYEELRE 120

10. LKGTAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLFSK ESWSYIAETP NPENGTCPYGP  
YFADYEELRE 120

11. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECESLISK ESWSYIVETP NPENGTCPYGP  
YFADYEELRE 120

12. LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPKCESLFSK ESWSYIAETP NPENGTCPYGP  
YFADYEELRE 120

13. LKGIAPLQLG NCSIAGWILG NPECESLFSK KSWYIAETP NSENGTCYGP  
YFADYEELRE 120

14. LKGIAPLQLG KCSIAGWILG NPECESLFSK KSWYIAETP NSENGTCYGP  
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  
YFADYEFTRF 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 NPECDPLLPV RSWSYIVETP NSENGICYPG  
DFIDYEELRE 120
  - 27. LKGIAPLQLG KCNITGWLLG NPECDLLPA RSWSYIVETP NSENGACYPG  
DFIDYEELRE 120
  - 28. LKGIAPLQLG KCNIAGWLLG NPECDLLTA 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

## 038400

4. QLSSVSSFER FEIFPKTSSW PNHDSNKGVT AACPHAGAKS FYKNLIWLVK  
KGNLYPNLSK 180

5. QLSTVSSFER FEIFPKAISW PDHDATRGTT VACSHSGVNS FYRNLLSTVK  
KGNLYPNLSK 180

6. QLSTVSSFER FEIFPKATSW PNHDTTRGTT ISCSHSGANS FYRNLLWIVK  
KGNLYPNLSK 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 PKHNVTKGVT AACSHKGKSS FYRNLLWLTE  
KNGSYPNLSK 180

15. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PKHSVTRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE  
KNGSYPNLSK 180

16. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE  
KNGSYPNLSK 180

17. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNVTRGVT ASCSHKGKSS FYRNLLWLTE  
KNGSYPNLSK 180

18. QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTKGVT ASCSHKGRSS FYRNLLWLTK  
KNGSYPNLSK 180

19. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PNHTTR-GVT AACPHARKSS FYKNLVWLTE  
ANGSYPNLSR 179

20. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT AACSHKGKSS FYRNLLWLTE  
KNGSYPNLNK 180

21. QLSSVSSFER FEIFPKERSW PKHNITRGVT AACSHAGKSS FYKNLLWLTE  
TDGSYPKLSK 180

038400

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  
KEGSYPKLN 179

27. QLSSVSSLER FEIFPKESSW PNHTFN-GVT VSCSHRGKSS FYRNLLWLTK  
KGDSYPKLTN 179

28. QLSSVSSF EK FEIFPKTSSW PNHETTKGVT AACSYAGASS FYRNLLWLTK  
KGSSYPKLSK 180

\*\*\*\*\*:\*\*\*: \*\*\*\*.\* \*\* \*: \* \*\*.:\*.: \* \*\*:\*\*:\*\*\*.. \*\*:.:..

1. SYANNKEKEV LVLWGVHPP NIGDQRALYH KENAYVSVVS SHYSRKFTPE  
IAKRPKVRDQ 239

2. SYANNKEKEV LVLWGVHPP NIGNQKALYH TENAYVSVVS SHYSRKFTPE  
IAKRPKVRDQ 239

3. SYVNNKEKEV LVLWGVHPP NIGNQKALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 239

4. SYINDKGKEV LVLWGIHPPS TSADQQSLYQ NADAYVSVGS SRYSKKFKPE  
IAIRPKVRXX 240

5. SYTNNKGKEV LVIWGVHPP TDSVQQTLYQ NKHTYVSVGS SKYYKRFTPE  
IVARPKVRGQ 240

6. SYTNNKGKEV LVIWGVHPP TDSDQQTLYQ NNHTYVSVGS SKYYQRFTPE  
IVTRPKVRGQ 240

7. SYANNKEKEV LVLWGVHPP NIGDQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 239

8. SYANNKEKEV LVLWGVHPP NIGDQRALYH KENAYVSVVS SHYSRKFTPE  
IAKRPKVRDQ 239

9. SYVNKGKEV LVLWGVHPP NMGDQRALYH KENAYVSVLS SHYSRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 240

10. SYVNNKEKEV LVLWGVHPP NIGDQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE  
ITKRPKVRDQ 240

038400

11. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIRDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE  
IAKRPKVRGQ 239

12. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 240

13. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYNRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 240

14. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SHYNRRFTPE  
IAKRPKVRNQ 240

15. SYVNDKEKEV LVLWGVHHPS NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SHYNRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 240

16. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAKRPKVRGQ 240

17. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIEDQKTIYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRGQ 240

18. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIGDQRAIYH TENAYVSVVS SHYNRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 240

19. SYVNNQKEKEV LVLWGVHHPS NIEEQRALYR KDNAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAKRPKVRDQ 239

20. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIEDQKTLYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRGQ 240

21. SYVNNKEKEV LVLWGVHHPS NIEDQKTLYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRGQ 240

22. SYVNKKEKEV LILWGVHHPP NIENQKTLYR KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRGQ 240

23. SYVNKKGKEV LVLWGVHHPS SIKEQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRDQ 240

24. SYVNKKGKEV LVLWGVHHPS NIKDQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRGQ 239

25. SYVNKKGKEV LVLWGVHHPS NIKDQQTLYQ KENAYVSVVS SNYNRRFTPE  
IAERPVRGQ 240

26. SYVNKKGKEV LVLWGIHPP NSKEQONLYQ NENAYVSVVT SNYNRRFTPE  
IAERPVRDQ 239

27. SYVNKGKEV LVLWGVHHPS SSDEQQLYS NGNAYVSVAS SNYNRRFTPE  
IAARPVKDQ 239

28. SYVNKGKEV LVLWGVHHPP TGTDQQLYS NADAYVSVGS SKYNRRFTPE  
IAARPVRDQ 240

038400

```

** *.: *** *:***:***...:*** *.:*** *: *.*...:*.** *: *****:
1.  EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPRY  AFALSRGFGS  GIINSNAPMD
ECPAKCQTPQ 299
2.  EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPRY  AFALSRGFGS  GIINSNAPMD
KCPAKCQTPQ 299
3.  EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNAPMD
ECPAKCQTPQ 299
4.  EGRMYYWTL  VEPGDKITFE  ATGNLVVPRY  AFAMERNAGS  GIIISDTPVH
DCNTTCQTPK 300
5.  AGRMYYWTL  FDQGDITIFE  ATGNLIAPWH  AFALKKGSSS  GIMLSDAQVH
NCTTKCQTPH 300
6.  AGRMYYWTL  LDOGDTIIFE  ATGNLIAPWH  AFALNKGSSS  GIMISDAHVH
NCTTKCQTPH 300
7.  EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPRF  AFALSRGFGS  GIITSNAPMD
ECPAKCQTPQ 299
8.  EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPRY  AFALSRGFGS  GIINSNAPMD
ECPAKCQTPQ 299
9.  EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIIISNASMG
ECPAKCQTPQ 300
10. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNASMG
ECPAKCQTPQ 300
11. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNAPMN
ECPAKCQTPQ 299
12. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNASMD
ECPAKCQTPQ 300
13. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNASMD
ECPAKCQTPQ 300
14. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNASMD
ECPAKCQTPQ 300
15. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNVSM
ECPAKCQTPQ 300
16. EGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWY  AFALSRGFGS  GIITSNASMD
ECPAKCQTPQ 300
17. AGRINYYWTL  LEPGDTIIFE  ANGNLIAPWH  AFALNRGFGS  GIITSNASMD
ECPAKCQTPQ 300

```

038400

18. EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMD  
 ECDAKCQTPQ 300

19. SGRMNYWTL LEPGDTIIFE ATGNLIAPWY AFALSRGPGS GIITSNAPLD  
 ECDTKCQTPQ 299

20. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWH AFALSRGFGS GIITSNASMD  
 ECDTKCQTPQ 300

21. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRDFGS GIITSNASMD  
 ECDTKCQTPQ 300

22. AGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALNRGIGS GIITSNASMD  
 ECDTKCQTPQ 300

23. AGRMNYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH  
 ECDTKCQTPQ 300

24. AGRINYYWTL LKPGDTIMFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH  
 ECDTKCQTPQ 299

25. AGRMNYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPWY AFALSRGFGS GIITSNASMH  
 ECNTKCQTPQ 300

26. AGRMNYWTL LKPGDTIIFE ANGNLIAPMY AFALRRGFGS GIITSNASMH  
 ECNTKCQTPQ 299

27. HGRMNYWTL LEPGDTIIFE ATGNLIAPWY AFALSRGFES GIITSNASMH  
 ECNTKCQTPQ 299

28. AGRMNYWTL LEPGDTITFE ATGNLIAPWY AFALNRGSGS GIITSNAPVH  
 DCNTKCQTPH 300

\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*.\* \*\* \*.\*\*\*:.\*. \*\*\*: \*. \* \*\*\* \*:..: .\*:..\*\*\*\*

1. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSACLK MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI  
 AGFIEGGWTG 359

2. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSACLK MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI  
 AGFIEGGWTG 359

3. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSACLK MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI  
 AGFIEGGWTG 359

4. GAINSSLPFQ NIHPITIGKC PKYVKSTKLR LATGLRNIPS IQSRGLFGAI  
 AGFIEGGWTG 360

5. GALKNNLPLQ NVHLFTIGEC PKYVKSTQLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI  
 AGFIEGGRTG 360

6. GALKSNLPLQ NVHPSTIGEC PKYVKSTQLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI  
 AGFIEGGWTG 360

038400

7. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI  
AGFIEGGWTG 359

8. GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSKLR 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

038400

25. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI  
AGFIEGGWTG 360

26. GAINSSLPYQ NIHPVTIGEC PKYVRSKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI  
AGFIEGGWTG 359

27. GSINSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MVTGLRNIPS IQYRGLFGAI  
AGFIEGGWTG 359

28. GAINSSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVRSTKLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI  
AGFIEGGWTG 360

\*:\*.:.\*\*:\* \*:\*.\*\*\*:\* \*\*\*\*:\*.\*\*\*:..\*\*\*\*\*:\*\*:\*

\*\*\*\*\* \*

1. MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 419

2. MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 419

3. MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 419

4. MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DLKSTQNAID EITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNHLEKR 420

5. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQIAID GINNKANSVI GKMNQILTSV  
GKEFNSLEKR 420

6. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQIAID GINNKVNSII EKMNTQFTSV  
GKEFNDLEKR 420

7. MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 419

8. MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 419

9. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSII EKMNTQFTAV  
GKEFNKLEKR 420

10. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAID GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 420

11. MMDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 419

12. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 420

13. MIDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI EKMNTQFTAV  
GKEFNKLERR 420



## 038400

3. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 479

4. IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDYHDSNVK NLYEKVRSQL  
KNNAKEIGNG 480

5. KENLNKTVDD RFLDVWTFNA ELLVLEENQR TLEFHDLNIK SLYEKVKSHL  
RNNDEKEIGNG 480

6. IENLNKKVDD GFLDVWTYNA ELLILLENER TLDFHDFNVK NLYEKVKSQL  
RNNAKEIGNG 480

7. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 479

8. MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 479

9. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDLNVK NLYEKVKNQL  
KNNAKEIGNG 480

10. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKTQL  
KNNAKEIGNG 480

11. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 479

12. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENGR TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

13. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

14. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

15. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

16. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

17. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

18. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

19. MENLNKKVDD GFMDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL  
RNNAKELGNG 479

20. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

038400

21. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL  
RNNAKEIGNG 480

22. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL  
RNNAKEIGNG 480

23. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLILLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
RNNAKEIGNG 480

24. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKNQL  
RNNAKEIGNG 479

25. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
RNNAKEIGNG 480

26. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 479

27. MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDLNVK NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 479

28. IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDFHDSNVR NLYEKVKSQL  
KNNAKEIGNG 480

:\*\*\*:\*\*\* \*\*:\* \*\*:\* \* \*\*:\* \*\*:  
\*\*\*\*\*:.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*

1. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

2. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

3. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

4. CFEFYHKCDN TCMESVKNGT YDYPKYSEEA KLNREEIDGV KLESTRIYQI  
LAIYSTVASS 540

5. CFEFYHKRDN ECLECVKNGT YNYPKYSEES KFNREEIVGV KLESMGIHQI  
LAIYSTVASS 540

6. CFEFYHKCDN ECMESVKNGT YNYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVHQI  
LAIYSTVASS 540

7. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

8. CFEFYHKCND ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

9. CFEFYHKCNN ECMESVKNGT YDYPKYSKES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 540

038400

10. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 540

11. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

12. CFEFYHCCNN ECMESVKNGT YDYPKYSEES KLNREGKIDGV 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. CFEFYHKCDN ECMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREKVDGV KLESMGIYQI  
LAIYSTVASS 539

27. CFEFYHKCDN ECMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 539

28. CFEFYHKCDD ACMESVRNGT YDYPKYSEES KLNREEIDGV KLESMGVYQI  
LAIYSTVASS 540

\*\*\*\*\*:; \*\*\*\*\*:\*\*\* \*\*\*\*\*:~\*~\* \*\*\*\*\*.:\*\*\* \*\*\*\*\* :~\*~\*  
\*\*\*\*\*.\*\*\*

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

Полипептиды, экспрессированные в *P. pastoris*. Экспрессию и связывание с CR6261 определяли согласно описанному и рассчитывали соотношение

сигналов связывания и экспрессии

SET1	clone	CR6261 binding signal	HTRF signal	ratio	fold increase of ratio over parental H1 mini-HA	Fusion peptide area						B-loop									
						337		340		352		402		406		409		413		416	
						E, I, K, V	I, K, R, T	D, F, V, Y	I, K, R, T	E, K, M, V	F, I, N, S, T, Y	A, G, I, R, T, V	F, I, N, S, T, Y	H, I, L, N, R, S							
239E11	1076944	1492	721,81	121,52	K	I	Y	T	M	F	I	N	R								
127H1	800024	6572	121,73	20,49	K	K	F	T	M	Y	I	Y	S								
171E5	879704	11508	76,44	12,87	K	T	F	T	M	I	A	F	S								
239D2	570424	9279	61,47	10,35	K	K	F	T	M	I	V	F	N								
247B2	414984	7583	54,73	9,21	K	I	Y	T	V	Y	I	F	S								
253D4	395824	7546	52,45	8,83	K	T	F	T	M	Y	A	Y	H								
252F5	421824	8621	48,93	8,24	V	K	Y	T	M	Y	V	Y	N								
220C9	1086064	22606	48,04	8,09	K	T	F	T	M	F	T	Y	L								
125D3	139824	2937	47,61	8,02	K	K	F	T	M	Y	G	T	H								
137C11	416504	9167	45,44	7,65	V	K	F	T	M	Y	I	N	H								
131B5	844344	20419	41,35	6,96	K	T	F	T	M	I	V	Y	H								
233F11	583024	14389	40,52	6,82	K	K	Y	T	M	T	I	G	S								
234C5	377864	9465	39,92	6,72	I	I	Y	T	M	F	T	N	L								
115A1	1176904	30389	38,73	6,52	K	K	Y	T	M	I	V	Y	I								
185G7	505864	13560	37,31	6,28	K	K	Y	T	M	I	V	I	S								
275D4	327344	9030	36,25	6,10	K	K	Y	T	M	T	T	S	S								
244B8	273744	7757	35,29	5,94	I	T	Y	T	M	Y	A	I	S								
252B8	284984	8252	34,54	5,81	K	I	Y	T	M	S	I	N	L								
213C11	667024	20624	32,34	5,44	V	K	Y	T	M	I	V	F	H								
174G3	491184	15320	32,06	5,40	K	T	Y	K	V	S	G	Y	L								
125D10	133904	4241	31,57	5,31	K	I	Y	T	M	Y	V	N	R								
127A7	233064	7498	31,08	5,23	E	T	Y	T	M	I	I	I	L								
304G11	110504	3588	30,8	5,19	K	K	Y	K	M	F	T	F	S								
162A11	364024	11939	30,49	5,13	V	K	Y	T	M	F	A	F	I								
271F10	315304	10348	30,47	5,13	I	K	Y	T	M	I	A	I	L								
218G11	958504	33710	28,43	4,79	I	T	Y	I	M	I	I	I	N								
251C8	269544	9634	27,98	4,71	K	T	Y	K	M	Y	I	N	L								
258A6	165624	6004	27,59	4,64	I	T	Y	T	M	Y	T	F	H								
134A4	456304	17366	26,28	4,42	K	I	Y	I	M	I	A	Y	N								
214C11	317904	12120	26,23	4,42	E	I	Y	T	M	Y	V	S	S								
182G8	399864	15262	26,2	4,41	K	K	Y	T	M	T	V	I	I								
113E7	966064	38018	25,41	4,28	K	K	F	T	M	Y	T	I	H								
230G9	854584	34093	25,07	4,22	K	K	Y	T	M	Y	T	F	R								
222G4	419064	16996	24,66	4,15	K	T	F	I	V	I	I	Y	L								
182D7	418944	17096	24,51	4,13	I	T	Y	T	M	I	I	F	N								
272H2	263264	10844	24,28	4,09	K	T	Y	T	M	S	A	N	H								
191C8	309064	12753	24,23	4,08	I	T	Y	T	V	I	A	F	I								
123C10	237824	9843	24,16	4,07	K	I	Y	K	M	F	A	T	L								
284B9	1663504	70812	23,49	3,95	K	T	Y	R	M	I	R	T	L								
134A3	531784	23414	22,71	3,82	K	K	F	I	M	I	I	N	S								
188F4	287384	12888	22,3	3,75	K	K	Y	T	M	S	V	T	H								
189B7	336344	15207	22,12	3,72	E	T	F	T	M	Y	V	F	N								
148D5	329144	14994	21,95	3,70	E	T	Y	I	M	F	G	S	H								
194C8	242304	11113	21,8	3,67	I	T	F	T	M	F	V	F	I								
188A8	279144	13001	21,47	3,61	K	T	Y	K	M	F	V	S	I								
162B3	279584	13159	21,25	3,58	V	T	Y	T	M	Y	T	N	N								
204C5	832784	39330	21,17	3,56	V	K	F	T	V	I	I	Y	L								
216E5	334904	15873	21,1	3,55	V	T	F	T	M	F	R	Y	R								
129C2	199464	9486	21,03	3,54	V	R	Y	I	M	I	I	Y	S								
286E8	158704	7662	20,71	3,49	E	I	F	T	M	F	I	Y	S								
264G4	180504	8751	20,63	3,47	K	R	Y	T	V	I	V	F	S								
214C4	302264	14709	20,55	3,46	I	I	F	T	V	F	A	S	S								
125A8	212224	10327	20,55	3,46	K	I	F	T	V	I	V	Y	I								

038400

123G2	498584	24442	20,4	3,43	I	T	Y	I	M	Y	T	F	L
187C6	345464	16932	20,4	3,43	E	K	Y	K	M	F	I	I	H
134H10	591704	29253	20,23	3,41	K	T	Y	T	V	I	T	F	I
187H10	299224	15289	19,57	3,29	K	T	Y	I	M	I	G	F	L
101D4	336584	17243	19,52	3,29	I	K	Y	I	M	I	I	S	N
193B6	206904	10650	19,43	3,27	K	K	Y	R	M	F	I	S	N
137C5	295944	15406	19,21	3,23	I	R	F	T	V	I	I	N	N
112F3	449824	24169	18,61	3,13	V	R	F	I	M	I	I	Y	S
176A5	193104	10476	18,43	3,10	I	T	F	T	V	F	I	F	I
213B2	131704	7178	18,35	3,09	K	K	Y	T	M	T	V	F	L
307A10	114984	6348	18,11	3,05	I	K	F	T	M	Y	G	Y	H
126C3	219944	12413	17,72	2,98	E	T	F	I	M	F	G	T	I
263B6	151184	8800	17,18	2,89	I	T	Y	I	M	S	T	Y	I
138F11	147864	8788	16,83	2,83	E	R	Y	R	M	F	V	F	L
134D3	303504	18129	16,74	2,82	E	R	F	I	M	Y	T	F	S
131D5	344504	20857	16,52	2,78	V	T	Y	I	V	Y	A	F	S
138F8	347704	21081	16,49	2,78	K	T	Y	I	M	Y	A	F	H
301F11	116904	7108	16,45	2,77	V	T	F	T	V	Y	I	S	H
112G6	543944	33149	16,41	2,76	V	R	Y	I	M	F	I	S	I
245C9	180024	10980	16,4	2,76	V	R	F	T	V	F	V	T	L
123E2	477064	29184	16,35	2,75	V	T	Y	T	V	F	V	F	S
266A11	90584	5696	15,9	2,68	V	T	Y	T	M	Y	I	T	R
104C4	521224	34458	15,13	2,55	V	K	Y	I	M	F	G	F	N
194E4	408584	27424	14,9	2,51	E	K	F	T	M	I	T	F	I
206B11	358744	24697	14,53	2,45	V	R	Y	T	M	F	T	I	L
192C4	343184	23932	14,34	2,41	K	T	Y	K	M	I	V	T	N
125H3	317384	22785	13,93	2,35	I	T	F	T	M	I	A	Y	R
145C9	182344	13108	13,91	2,34	I	T	F	I	V	Y	I	S	N
243D6	132144	9596	13,77	2,32	I	R	F	T	M	N	V	Y	R
182D3	142664	10487	13,6	2,29	I	T	Y	R	M	F	A	G	S
181H9	310504	23153	13,41	2,26	V	K	F	I	M	F	V	F	N
163E3	183544	14033	13,08	2,20	E	K	Y	K	M	I	V	I	L
145E7	132224	10312	12,82	2,16	I	T	F	K	V	I	I	F	S
275G3	115104	9180	12,54	2,11	V	T	Y	I	M	T	A	S	S
191D5	123824	10048	12,32	2,07	I	R	F	T	M	T	G	F	S
188G10	142504	11593	12,29	2,07	V	T	Y	I	V	I	A	F	S
171F6	140464	11555	12,16	2,05	K	T	Y	T	M	S	T	Y	L
125C2	83624	7009	11,93	2,01	I	I	F	T	V	I	T	S	S
206B8	285824	24166	11,83	1,99	V	I	Y	T	M	I	T	F	H
145F2	498504	42457	11,74	1,98	I	K	F	T	M	F	R	F	S
199F3	328504	29850	11,01	1,85	K	T	Y	T	M	N	G	S	S
181H11	186664	17205	10,85	1,83	V	T	Y	T	M	I	I	N	R
188C8	113344	10520	10,77	1,81	I	K	Y	T	M	S	T	Y	L
189E10	188864	18252	10,35	1,74	K	T	Y	T	M	S	G	S	S
146G7	533864	52422	10,18	1,71	V	T	Y	I	M	Y	T	T	I
182H2	109624	10976	9,99	1,68	K	I	F	T	V	I	I	T	L
262B9	94744	9584	9,89	1,66	I	K	Y	T	M	F	R	F	R
145E8	211504	21732	9,73	1,64	E	K	F	K	V	I	V	F	I
249B11	145184	14995	9,68	1,63	K	K	F	T	M	S	T	G	H
182C6	92944	9939	9,35	1,57	K	R	D	I	M	F	I	N	N
SEQ ID NO: 6 AV + 2SD			9,28	1,56									
SEQ ID NO: 6 AV	238077	40100	5,94	1,00									

Полипептиды, экспрессированные в *P. pastoris*.  
 Экспрессию и связывание с CR6261 определяли согласно описанному и  
 рассчитывали соотношения сигналов связывания и экспрессии

clone	CR6261 binding signal	HTRF signal	ratio	fold increase of ratio over parental SEQ ID NO: 6	Fusion peptide area				B-loop				
					337	340	352	353	402	406	409	413	416
					A, E, I, K, T, V	F, I, N, S, T, Y	A, D, F, I, N, S, T, V, Y	E, G, I, K, R, V	M, R, T	F, H, L, Y	F, I, S, T	E, K, M, V	I, L, R, S
86B4	1077144	13862	77,7	13,08	K	N	Y	K	M	F	I	M	I
7A7	987824	13452	73,43	12,36	T	N	Y	V	M	Y	F	E	R
55G7	616184	8767	70,28	11,83	K	N	Y	V	M	Y	I	M	L
71H2	1109984	16750	66,27	11,16	K	N	F	K	M	L	I	V	S
86B3	900904	14448	62,35	10,50	K	N	Y	K	M	L	I	V	R
71A4	1064144	17597	60,47	10,18	T	N	Y	V	M	Y	F	E	R
51G3	460304	7773	59,22	9,97	T	I	F	V	M	L	F	E	S
84B8	582144	10091	57,69	9,71	K	N	Y	I	M	F	F	M	S
79C2	364184	7116	51,18	8,62	T	N	Y	R	M	F	T	V	S
69G2	481344	9479	50,78	8,55	I	N	F	R	M	L	I	V	L
79D5	702584	13981	50,25	8,46	A	N	F	K	M	L	F	V	L
54H4	291744	5857	49,81	8,39	K	I	Y	K	M	L	I	E	L
11H6	427384	9146	46,73	7,87	K	N	Y	E	M	F	T	E	S
90A9	413664	9025	45,84	7,72	K	S	Y	V	M	Y	T	V	S
75G5	1011384	26695	37,89	6,38	E	S	Y	V	M	L	F	E	R
8A10	360104	9630	37,39	6,29	K	N	Y	V	M	L	I	V	R
72D4	329944	8881	37,15	6,25	V	N	F	R	M	F	S	M	S
74H9	1283144	35494	36,15	6,09	K	N	F	K	M	Y	F	M	S
88C5	471424	13355	35,3	5,94	K	N	Y	R	M	L	I	V	R
61A9	383064	10864	35,26	5,94	T	N	F	R	M	F	F	E	L
86H9	457344	13340	34,28	5,77	K	N	F	G	M	F	T	V	S
71D3	1573024	46711	33,68	5,67	I	S	Y	V	M	F	I	V	L
9C6	270984	8235	32,91	5,54	K	T	Y	V	M	Y	T	K	I
81F11	317824	9964	31,9	5,37	K	I	F	V	M	F	F	V	S
84E10	255064	7996	31,9	5,37	I	N	F	R	M	F	S	V	S
71C4	1350144	44339	30,45	5,13	K	N	F	G	M	F	I	V	S
84D3	84424	2920	28,91	4,87	E	N	F	K	M	L	I	E	S
96H8	205904	7224	28,5	4,80	K	Y	Y	K	M	F	I	M	S
85A7	235704	8416	28,01	4,72	K	N	Y	E	M	L	F	V	R
50G10	264144	9470	27,89	4,70	T	N	F	E	M	F	F	V	S
6A1	299824	10912	27,48	4,63	A	N	F	R	M	F	F	M	S
91C4	1157424	44837	25,81	4,35	K	N	F	G	M	L	I	M	R
2C4	258264	10139	25,47	4,29	I	N	F	V	M	F	I	V	L
63C3	188184	7625	24,68	4,15	E	T	Y	K	M	L	F	V	L
850	196024	8115	24,16	4,07	K	N	V	G	M	F	F	V	I
67C10	306104	12907	23,72	3,99	E	T	F	V	M	F	F	M	L
10F9	165984	7113	23,34	3,93	I	I	Y	V	M	Y	F	E	R
4C1	385504	16548	23,3	3,92	K	N	S	V	M	F	I	E	I
86G3	183944	7995	23,01	3,87	T	S	Y	V	M	F	T	V	L
51G10	215264	9727	22,13	3,73	A	N	Y	R	M	F	I	K	S
58A5	90744	4142	21,91	3,69	V	T	F	R	M	L	I	M	S
56F8	235344	10823	21,74	3,66	I	N	F	E	M	F	T	E	L
67C11	209184	9856	21,22	3,57	K	Y	Y	I	M	F	F	E	I
91C8	333584	16012	20,83	3,51	K	N	F	G	M	L	I	K	S
48B11	302864	14946	20,26	3,41	I	N	A	G	M	L	I	E	S
78F11	84104	4155	20,24	3,41	I	I	F	R	M	Y	F	E	I

76A10	136984	6841	20,02	3,37	I	Y	F	V	M	Y	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	166464	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	202704	10688	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
6E12	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	15,09	2,54	I	Y	F	V	M	Y	F	V	L
60A2	92664	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	T	N	A	K	M	L	T	E	S
36H2	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	8609	10,55	1,78	I	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	7994	9,77	1,64	E	I	F	I	M	F	F	V	S
70F6	418624	43334	9,66	1,63	K	N	I	G	M	L	T	E	R
26H1	79744	8268	9,64	1,62	E	N	F	I	M	L	S	V	I
78G2	56704	6055	9,36	1,58	V	I	Y	G	M	L	F	E	S
SEQ ID NO: 6 AV + 2SD			9,28	1,56									
SEQ ID NO: 238077		40100	5,94	1,00									

Таблица 5

## Полипептиды, экспрессированные в НЕК293F.

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

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

Таблица 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 (мг/л культуры)	Чистота по HP- SEC (%)	K <sub>d</sub> <sup>APP</sup> CR6261 (нМ)	K <sub>d</sub> <sup>APP</sup> 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

В табл. 8 приведены значения молекулярного веса, определенные с помощью SEC-MALS, для полипептидов по настоящему изобретению и их комплексов с Fab-фрагментами CR6261 и CR9114. Теоретические (теор.) значения оценивают на основании последовательности полипептида по настоящему изобретению (предполагая мономер) и дополнительного вклада приблизительно 10 кДа от присоединенных гликанов. Значения молекулярного веса Fab-фрагментов CR6261, CR9114 и CR8020 также определяли с помощью SEC-MALS, и они составили 48, 49 и 47 кДа соответственно.

Таблица 8

	SEQ ID NO:	Мол. вес (кДа)		Мол. вес комплекса с CR6261 (кДа)		Мол. вес комплекса с CR9114 (кДа)	
		Теор.	Наблюда- емый	Теор.	Наблю- даемый	Теор.	Наблю- даемый
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

Мутации, созданные в SEQ ID NO: 156.  
Соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 1  
(полноразмерный, wt HA) и SEQ ID NO: 52 также указаны

Набор 1			
Положение	остаток		введенные аминокислоты
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 156	
337	I	I	E, K, V
340	I	I	K, R, T
352	F	F	D, V, Y
353	I	I	K, R, T
406	F	S	I, N, T, Y, S
409	V	T	A, G, I, R, T, V
413	F	G	I, N, S, T, Y, G
416	L	S	H, I, N, R, S

Набор 2			
Положение	остаток		введенные аминокислоты
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 156	
337	I	I	A, E, K, T, V
340	I	I	F, N, S, T, Y
352	F	F	A, D, I, N, S, T, V, Y
353	I	I	E, G, K, R, V
406	F	S	F, H, L, Y, S
409	V	T	F, I, S, T
413	F	G	E, K, M, V, G
416	L	S	I, R, S

В табл. 10 приведены значения молекулярного веса, определенные с помощью SEC-MALS, для полипептидов по настоящему изобретению и их комплексов с Fab-фрагментами CR6261 и CR9114. Теоретические значения (приведенные в скобках) высчитаны на основании последовательности полипептида по настоящему изобретению (предполагая тример) 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 10

Название конструкции	** Мол. вес (кДа)		
	Белок	Белок в комплексе с	
		CRF9114	CRF6261
SEQ ID NO: 158	118 (120)	236 (246)	201 (255)
FL HA H1N1 *	210 (210)	343 (345)	396 (363)

\*Включенные данные для справки.

\*\*Как определено из SEC MALS; теоретические значения для тримерного FL HA или SEQ ID NO: 158 и тримерного FL HA или SEQ ID NO: 158 в комплексе с 3 Fab поданы в скобках.

Таблица 11

Полипептиды по настоящему изобретению, полученные из SEQ ID NO: 156 и выбранные, как описано в примерах 11 и 12. Указаны только остатки, которые изменялись в наборе 1 и наборе 2, все другие остатки идентичны SEQ ID NO: 156.

С-конец	название клона	SEQ ID NO:	число остатков							
			337	340	352	353	406	409	413	416
Flag-foldon-His		156	I	I	F	I	S	T	G	S
Flag-foldon-His	GW1,5D10	159	K	K	F	K	F	T	Y	N
	GW1,5E2	158	K	I	Y	K	I	T	T	R
	GW1,7H3	160	E	K	F	T	F	G	I	N
	GW1,9C7	161	K	I	Y	R	T	T	I	S
	GW1,8C7	162	E	R	F	K	Y	V	T	S
TCS-His	GW1,5E2	163	K	I	Y	K	I	T	T	R
	GW1,9A5	164	K	K	F	T	S	A	Y	S
	GW1,9E8	165	K	I	Y	K	F	A	T	N
	GW1,2C8	166	I	T	Y	K	S	V	Y	N

## 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](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1308701110).
- Mallajosyula et al. (2014)., [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1402766111](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1402766111).
- Parekh et al. (2012), *mAbs* 4: 310.
- 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)

MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50  
 ENSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP 100  
 NPENGTCPYG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA 150  
 SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPN 200  
 IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYWTLL 250  
 EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRRFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG 300  
 AINSSLPFQN VHPVTIGECF KYVRS AKLRM VTGLRNIPSI QSRGLFGAIA 350  
GFIEGGWGTM VDGWYGYHHQ NEQSGGYAAD QKSTQNAING ITNKVNSVIE 400  
KMNTQFTAVG KEFNKLERRM ENLNKKVDDG FIDIWTYNAE LVLLENEBPEMЯ

УДЕРЖИВАНИЯ 450

LDFHDSNVKN LYEKVKSOLK NNAKEIGNGC FEFYHKCNDE CMESVKNQTY 500  
 DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTVASSL VLLVSLGAIS 550  
 FWMCSNGSLQ CRICI 565

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

MKVKLLVLLC TFTATYA DTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50  
 ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL RNIPSIQSQG LFGAIAGFI GGWTGMVDGW 100  
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEKMNT QSTATGKEGN 150  
KSERMKQIED KIEEIESKQI WCYNAELLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200  
 VKSQLKNNAK EIGNGCFEFY HKCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250  
 KIDGVKLESM GYVQILAIYS TVASSLVLV SLGAISFWMC SNGSLQCRIC 300  
 I 301

SEQ ID NO: 3: foldon

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

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

SEQ ID NO: 5:  
 MKQIEDKIEEIESKQ

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

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)  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKSSGGTSNNYAIWVRQAPGGLDWMGGISPIFGSTA  
 YAQKFQGRVTISADIFSNATYMEINSLTSEDVAVYFCARHGNYYYSGMDVWVGQGTTVTVSS  
 >БЕЛОК VL ЦЕПИ SC09-114 (SEQ ID NO: 12)  
 SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVNHWYQQFPGTAPKLLIYSNDQRPVSV  
 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAEYYCAAWDDSLKGAVFGGGTQLTVL  
 >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)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDSVIFMSWVRQAPGKLECVSIIYIDSTYY  
 ADSVKGRFTISRHNMGTVFLEMNSLRPDDTAVYYCATESGDFGDQTPYHYAMDV  
 >БЕЛОК VL ЦЕПИ SC08-057 (SEQ ID NO: 14)  
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSGDIGGYNAVSWYQHHPGKAPKLMIEVTSRPSG  
 VSDRFSASRSGDTASLTVSGLQAEDEAHYYCCSFADSNILI

>BEJOK VH ЦЕПИ SC08-020 (SEQ ID NO: 17)  
 QVQLQQSGAEVKTPGASVKVSKASGYTFTRFGVSWIRQAPGGLEWIGWISAYNGD  
 YAQKFQARVTMTTDTSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWLDN

>BEJOK VL ЦЕПИ SC08-020 (SEQ ID NO: 18)  
 EIVXTQSPGTLSPGERATLSCRASQVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGI  
 PDRISGSGSGDFTLTISRLEPADFAVYYCQQYGTSPRT

SEQ ID NO: 52: H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2  
 MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VVTHSVNLL 50  
 ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL RNIPSIQSQG LFGAIAGFIE GGWTGMVDGW 100  
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEKMNT QSTATGKEGN 150  
 KSERRMKQIE DKIEEIESKI WCYNALLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200  
 VKSQKNNAK EIGNGCFEY HKCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250  
 KIDGVKLESM GYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAISFWMC SNGSLQCRIC 300  
 I 301

SEQ ID NO: 53: H1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t3  
 MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VVTHSVNLL 50  
 ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL RNIPSIQSQG LFGAIAGFIE GGWTGMVDGW 100  
 YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEKMNT QSTATGKEGN 150  
 KSRMKQIEDK IEEIESKQI WCYNALLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK 200  
 VKSQKNNAK EIGNGCFEY HKCNDECMES VKNGTYDYPK YSEESKLNRE 250  
 KIDGVKLESM GYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAISFWMC SNGSLQCRIC 300  
 I 301

SEQ ID NO: 55: 127H1  
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
 CSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
 INGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNALLVLENER  
 TLDHFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
 IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 56: 86B4  
 MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
 CSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
 INGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNALLVLENER  
 TLDHFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
 IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 57: 74H9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 58: 6E12

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNEPSNQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQLTAFGKEVNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 59: 55G7

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKL  
RMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGIT  
NKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLTLDFHDS  
NVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK  
LESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 60 : 115A1

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDG VKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 61: 71H2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 62: 181H9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNVPSKQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 63: 220C9

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPKSTQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKE I GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 64: 113E7

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKE I GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 65: s74H9

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKE I GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHH  
HH

SEQ ID NO: 66: s127H1

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKE I GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHH  
HH

SEQ ID NO: 67: s86B4

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAAGYEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKE I GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHH  
HH

SEQ ID NO: 68: s55G7

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKE I GNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHH  
HH

SEQ ID NO: 69: s6E12

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSN  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAFGKEVKNLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 70: s115A1

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 71: s71H2

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAIGKEVKNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 76: s181H9

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNVPSK  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAVGKEFNKNERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 77: s220C9

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 78: s113E7

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 72: s74H9-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAFGKEMNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 73: s127H1-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEYNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 74: s86B4-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAIGKEMNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 75: s55G7-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEMNKLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 144: s6E12-long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSN  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAFGKEVKNLERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 79: s115A1ong

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QITAVGKEYNKIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 80: s71H2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAIGKEVKNKSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 81: 127H1-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGK  
YVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 82: 86B4-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGK  
YVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 83: 74H9-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGK  
YVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTAIFGKEMNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 84: 6E12-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGK  
YVCSAKLRMVTGLRNEPSNQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQLTAIFGKEVNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 85: 55G7-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGK  
YVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 86 : 115A1-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGK  
YVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 87: 71H2-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 88: 181H9-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNVPSKQSQGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 89: 220C9-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 90: 113E7-t2

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 91: s127H1-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 92: s86B4-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAIGKEMNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 93: s74H9-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAFGKEMNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 94: s6E12-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSN  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAFGKEVKNLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 95: s55G7-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGL  
FGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAI  
GKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHHH  
HH

SEQ ID NO: 96 : s115A1-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QITAVGKEYNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 97: s71H2-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAIGKEVKNSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 98: s181H9-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNVPSK  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAVGKEFNKNERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 99: s220C9-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPST  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTATGKEYNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 100: s113E7-t2

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEINKHERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 101: s127H1-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 102: s86B4-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAIGKEMNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 103: s74H9-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAFGKEMNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 104: s6E12-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSN  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAFGKEVKNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 105: s55G7-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGL  
FGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAI  
GKEMNKLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFFFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 106: s115A1-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QITAVGKEYNKIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 107: s71H2-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QQGLFGAIAGFKKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAIGKEVKNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 108: s181H9-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAVGKEFNKNERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 109: s220C9-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTATGKEYNKLEERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 110: s113E7-t2long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTATGKEINKHERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 111: 127H1-t3

MKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSKQQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 112: 86B4-t3

MKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSNQQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERL

DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 113: 74H9-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTAFGKEMNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 114: 6E12-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNEPSNQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQLTAFGKEVNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 115: 55G7-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKL  
RMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGIT  
NKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTLDFHDS  
NVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVK  
LESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 116 : 115A1-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQITAVGKEYNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 117: 71H2-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQLTAIGKEVNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 118: 181H9-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNVPSKQSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKNRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERTL

DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 119: 220C9-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPKSTQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQFTATGKEYNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 120: 113E7-t3

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYV  
CSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNA  
INGITNKVNSVIEKMNTQYTATGKEINKHRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TL  
DFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREK  
IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 121: s127H1-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEYNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 122: s86B4-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAIGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 123: s74H9-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAFGKEMNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 124: s6E12-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSN  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAFGKEVNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ

LKNNAKEI GN GCFE FYH KCN DECMESVKN GTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 125: s55G7-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGL  
FGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAI  
GKEMNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNNA  
KEI GN GCFE FYH KCN DECMESVKN GTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 126 : s115A1-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QITAVGKEYNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEI GN GCFE FYH KCN DECMESVKN GTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 127: s71H2-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAIGKEVNKSRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEI CN GCFE FYH KCN DECMESVKN CTYDYPKYSEESKLNREKIDCRSLVPRGSPCHHHH  
HH

SEQ ID NO: 128: s181H9-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRNVP SK  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAVGKEFNKNRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEI GN GCFE FYH KCN DECMESVKN GTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 129: s220C9-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPST  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTATGKEYNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEI GN GCFE FYH KCN DECMESVKN GTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 130: s113E7-t3

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLENGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTATGKEINKHRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ

LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGRSLVPRGSPGHHHH  
HH

SEQ ID NO: 131: s127H1-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAIGKEYNKS RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 132: s86B4-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAIGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 133: s74H9-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTAFGKEMNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 134: s6E12-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNEPSN  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QLTAFGKEVNKL RMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 135: s55G7-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSNQSQGL  
FGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAI  
GKEMNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 136: s115A1-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSK  
QSQGLFGAIAGYTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QITAVGKEYNKIRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 137: s71H2-t3long

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSN  
QSQGLFGAIAGFKKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT

QLTAIGKEVKNKSRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 138: s181H9-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNVPSK  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAVGKEFNKNRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 139: s220C9-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNPST  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTATGKEYNKLRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 140: s113E7-t3long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNPST  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTATGKEINKHRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 141: s181H9long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNVPSK  
QSQGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTAVGKEFNKNRMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 142: s220C9long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNPST  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QFTATGKEYNKLERMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 143: s113E7long

DTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNPST  
QSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNT  
QYTATGKEINKHERMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQ  
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEG

SEQ ID NO: 149: smH1 Cali3964-55G7

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLEDDGGGKYV  
CSTKLRRLATGLRNPSTQSQGLFGAIAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNHLERMKQIEDKIEEIESKQKIWCYNAELLVLENERL

DYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 150: smH1 Cali3964-86B4

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYV  
CSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNHIERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERTL  
DYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 151: smH1 Cali3964-127H1

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYV  
CSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNHSERMKQIEDKIEEIESKQIWCYNAELLVLENERTL  
DYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 152: \_smH1 Cali3964-55G7-t2

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYV  
CSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYVEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEMNHLERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL  
DYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 153: \_smH1 Cali3964-86B4-t2

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYV  
CSTKLRLATGLRNKPSNQSQGLFGAIAAGYKEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQFTAIGKEMNHIERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL  
DYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 154: smH1 Cali3964-127H1-t2

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYV  
CSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNHSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL  
DYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGRSLVPRGSPGHHHHHH

SEQ ID NO: 155: mH1 Cali3964-127H1-t2

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDGGGGKYV  
CSTKLRLATGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNA  
IDEITNKVNSVIEKMNTQYTAIGKEYNHSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERTL

DYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIENGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREE  
IDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAIISFWMCNGLQCRICI

SEQ ID NO: 156: sH1-mini2-cluster1+5+6-GCN4t2 без лидерной  
последовательности и с FLAG-foldon-HIS

DTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL  
RNIPSIQSQG LFGAIAGFIE GGWTGMVDGW YGYHHQNEQG SGYAADQKST  
QNAINGITNK VNSVIEKMNT QSTATGKEGN KSERRMKQIE DKIEEIESKI  
WCYNAELLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK VKSQLKNNAK EINGCFEFY  
HKCNDECMES VKNNGTYDYPK YSEESKLNRE KIDGVSGRDY KDDDDKPGSG  
YIPEAPRDGQ AYVRKDGWV LLSTFLGHHH HHH

SEQ ID NO: 157: mini-HA H1 GW1.5E2

MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL  
ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL RNKPSIQSQG LFGAIAGYKE GGWTGMVDGW  
YGYHHQNEQG SGYAADQKST QNAINGITNK VNSVIEKMNT QITATGKETN  
KRERRMKQIE DKIEEIESKI WCYNAELLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK  
VKSQLKNNAK EINGCFEFY HKCNDECMES VKNNGTYDYPK YSEESKLNRE  
KIDGVKLESM GYQILAIYS TVASSLVLLV SLGAIISFWMC NGLQCRICI

SEQ ID NO: 158 mini-HA sH1 GW1.5E2-FFH (#5145)

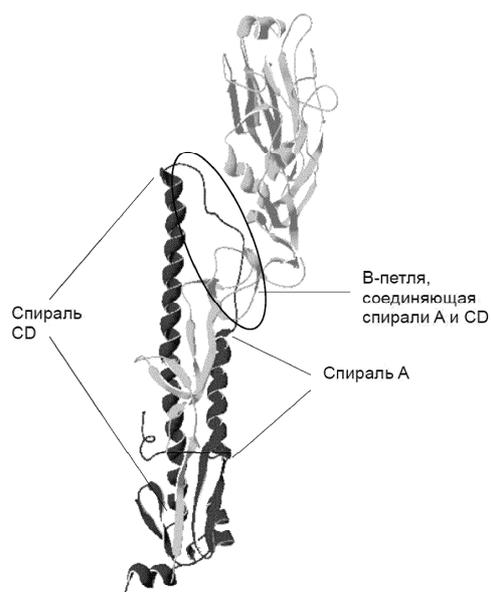
DTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL ENGGGGKYVC SAKLRMVTGL  
RNKPSIQSQG LFGAIAGYKE GGWTGMVDGW YGYHHQNEQG SGYAADQKST  
QNAINGITNK VNSVIEKMNT QITATGKETN KRERRMKQIE DKIEEIESKI  
WCYNAELLVL LENERTLDFH DSNVKNLYEK VKSQLKNNAK EINGCFEFY  
HKCNDECMES VKNNGTYDYPK YSEESKLNRE KIDGVSGRDY KDDDDKPGSG  
YIPEAPRDGQ AYVRKDGWV LLSTFLGHHH HHH

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид стеблевого домена гемагглютинаина вируса гриппа, происходящий из вируса гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 1), содержащий аминокислотную последовательность:

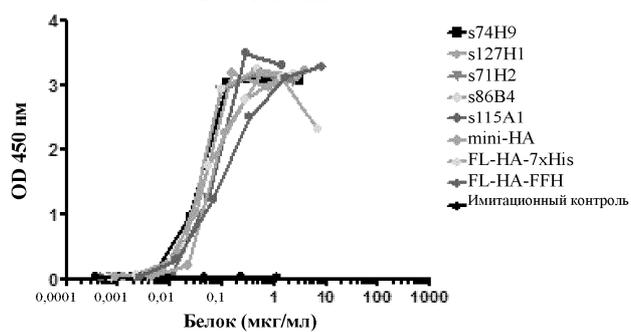
DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENGGGGKYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQ  
SQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQ  
YTAIGKEYNKSERRMKQIEDKIEEIESKIWCYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQL  
KNNAKEIENGCFEFYHKCNDECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDG (SEQ ID NO:  
146).

2. Полипептид по п.1, избирательно связывающийся с антителами CR6261 и/или CR9114.
3. Полипептид по п.1 или 2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 101.
4. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1, 2 или 3.
5. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.4.
6. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1, 2 или 3 и/или молекулу нуклеиновой кислоты по п.4, для индукции иммунного ответа против вируса гриппа А.
7. Применение полипептида по любому из пп.1, 2 или 3 для индукции иммунного ответа против вируса гриппа А.
8. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.4 для индукции иммунного ответа против вируса гриппа А.
9. Применение вектора по п.5 для индукции иммунного ответа против вируса гриппа А.
10. Применение полипептида по любому из пп.1, 2 или 3 в качестве вакцины против вируса гриппа А.
11. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.4 в качестве вакцины против вируса гриппа А.
12. Применение вектора по п.5 в качестве вакцины против вируса гриппа А.

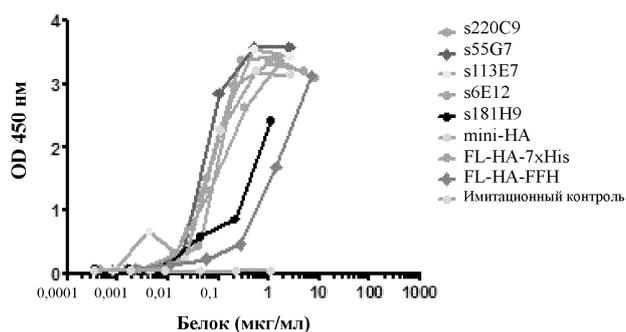


Фиг. 1

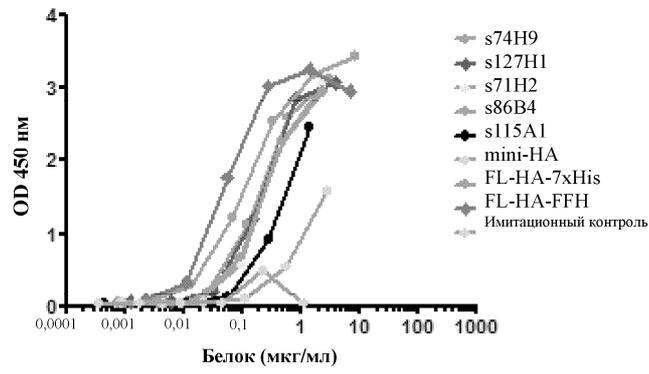
**А** Захват с помощью CR9114; выявление антитела к HIS



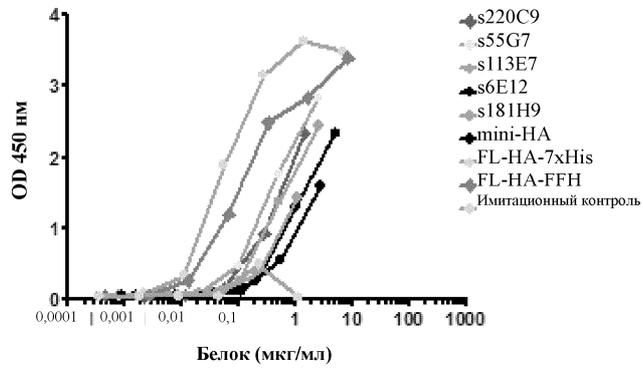
**В** Захват с помощью CR9114; выявление антитела к HIS



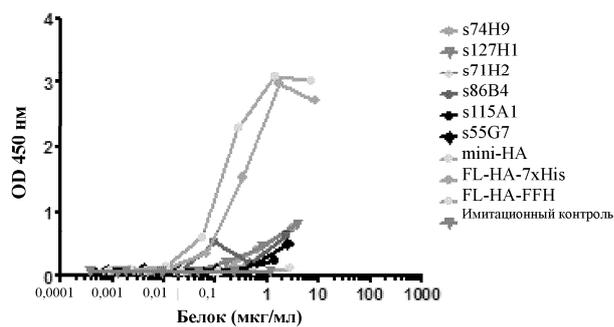
**C** Захват с помощью CR6261; выявление антитела к HIS



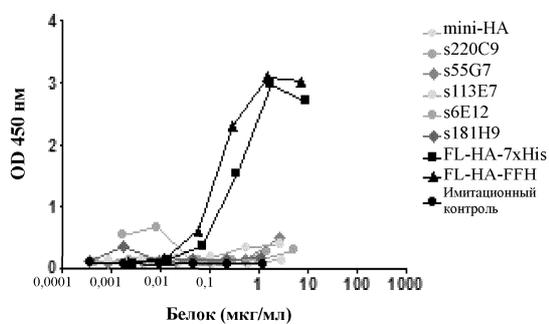
**D** Захват с помощью CR6261; выявление антитела к HIS



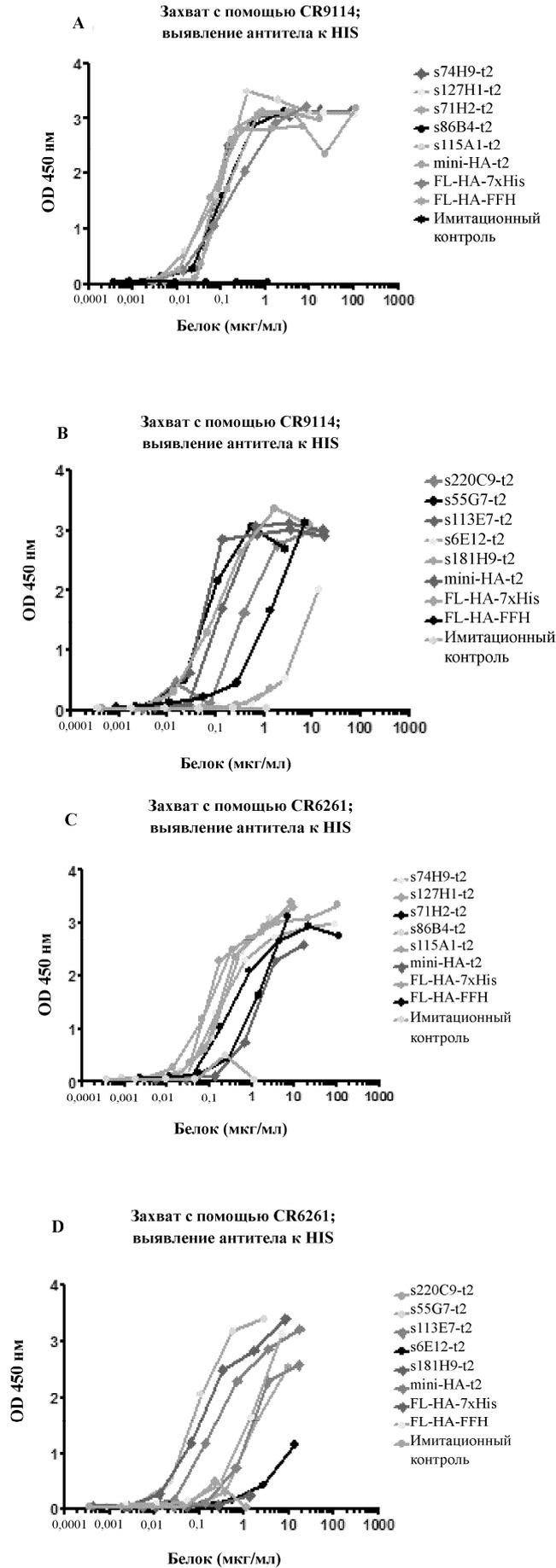
**E** Захват с помощью CR9114; выявление CR9114-B//SA-  
HRP

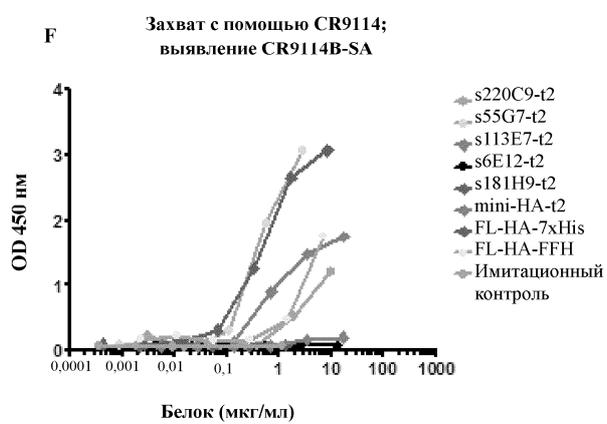
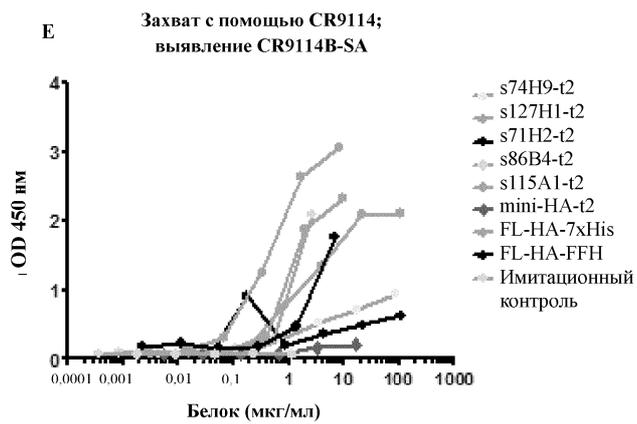


**F** Захват с помощью CR9114; выявление CR9114-B//SA-  
HRP

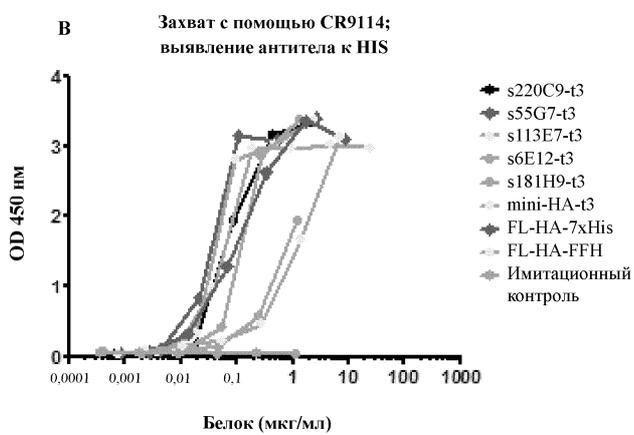
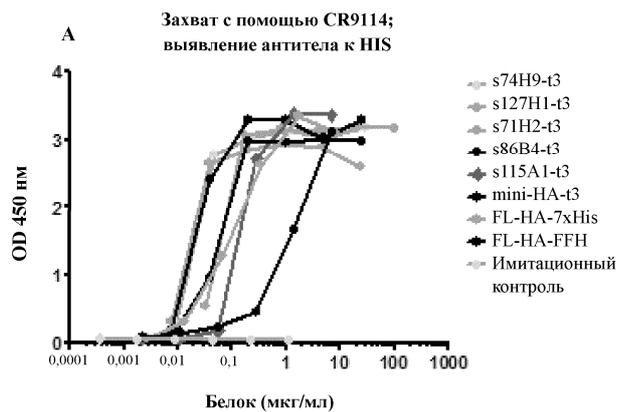


Фиг. 2

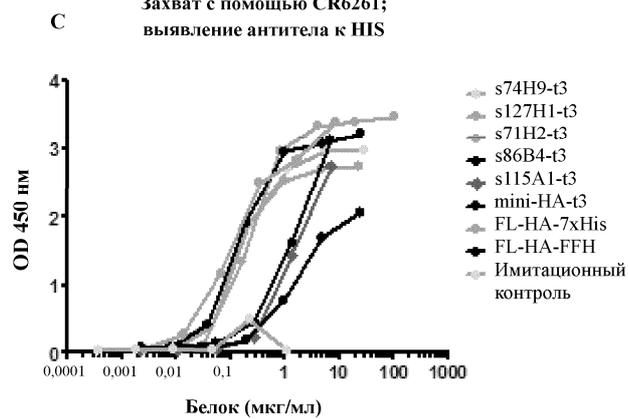




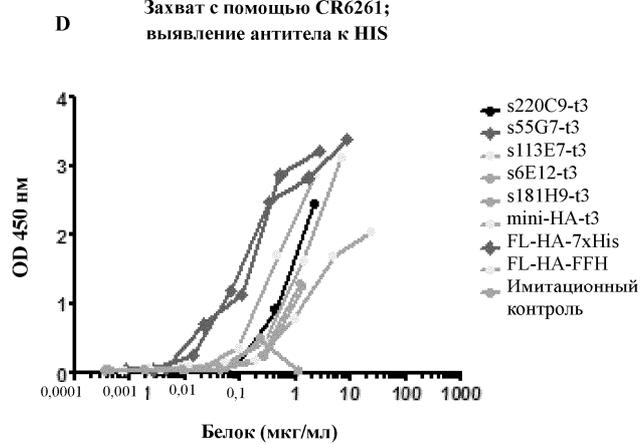
Фиг. 3

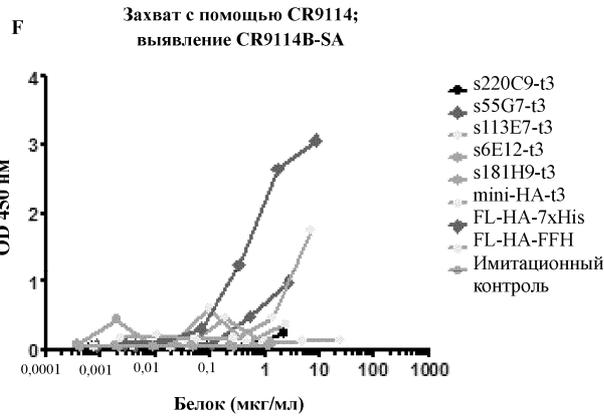
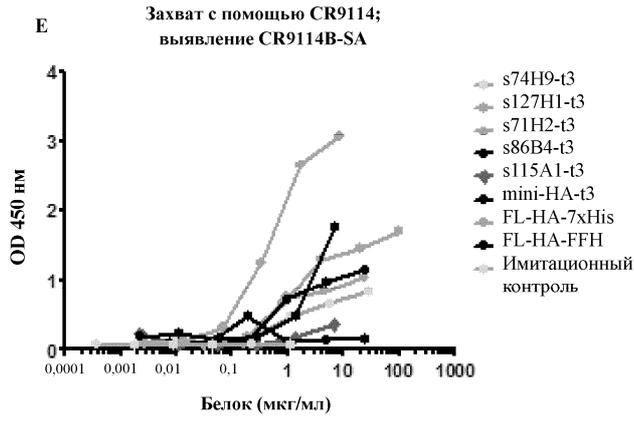


Захват с помощью CR6261;  
выявление антитела к HIS

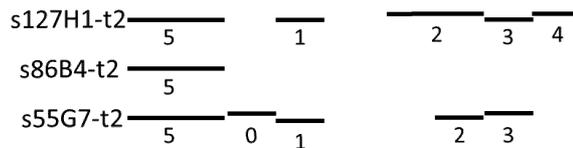
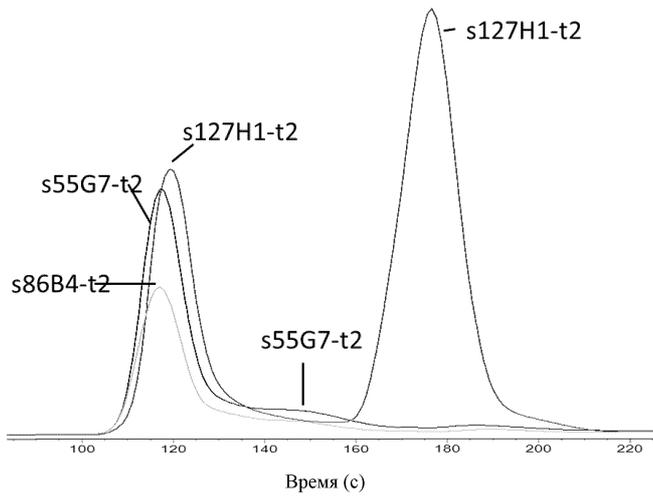


Захват с помощью CR6261;  
выявление антитела к HIS

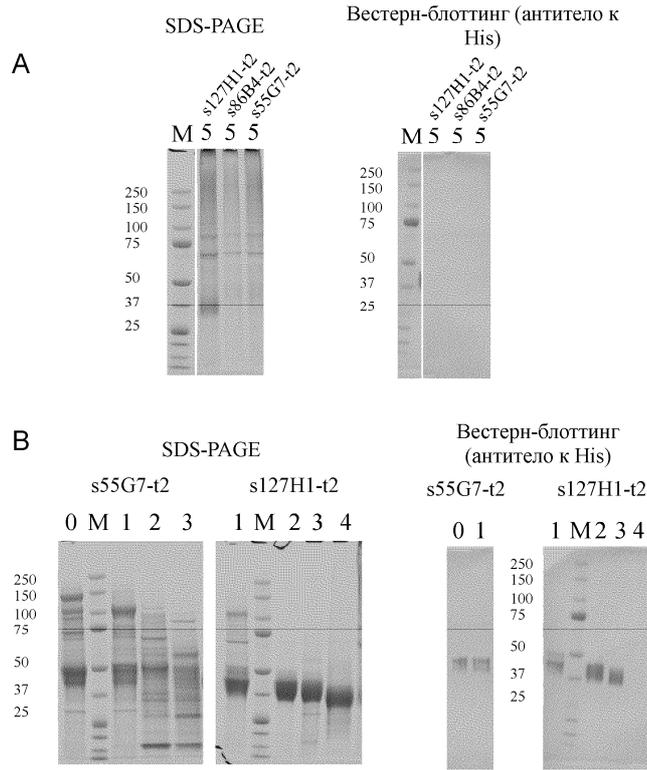




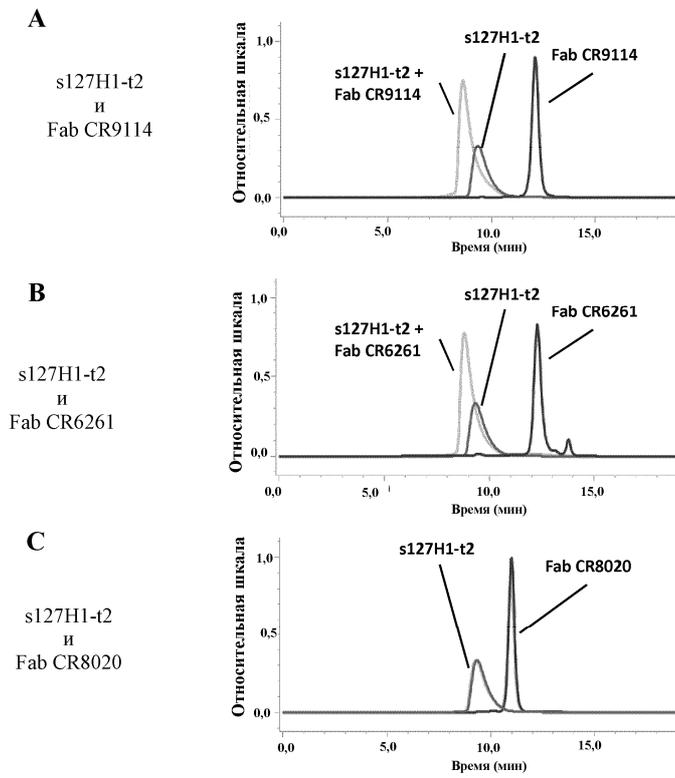
Фиг. 4



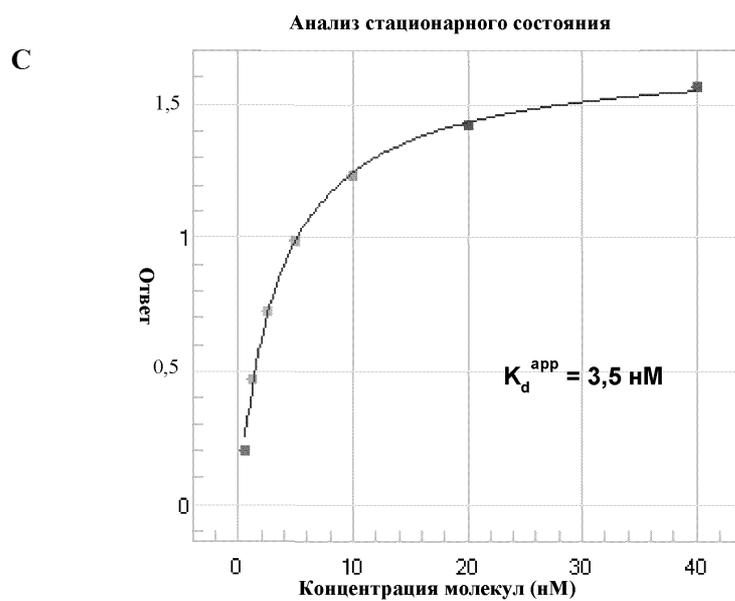
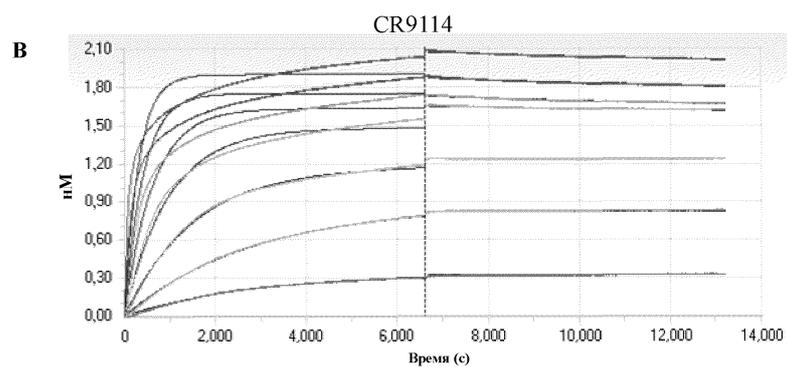
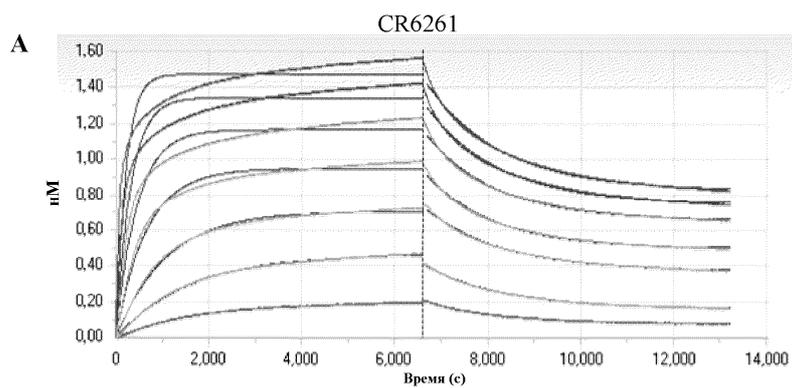
Фиг. 5



Фиг. 6

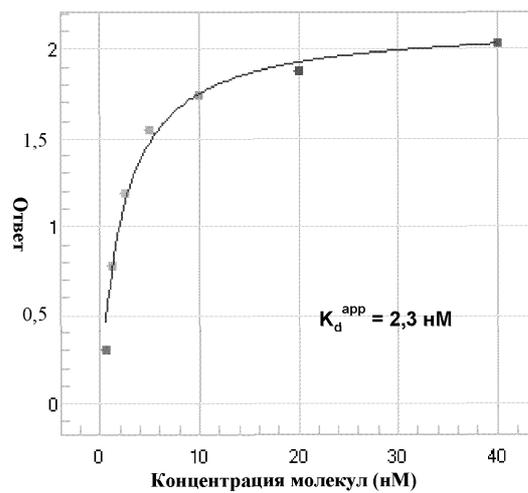


Фиг. 7

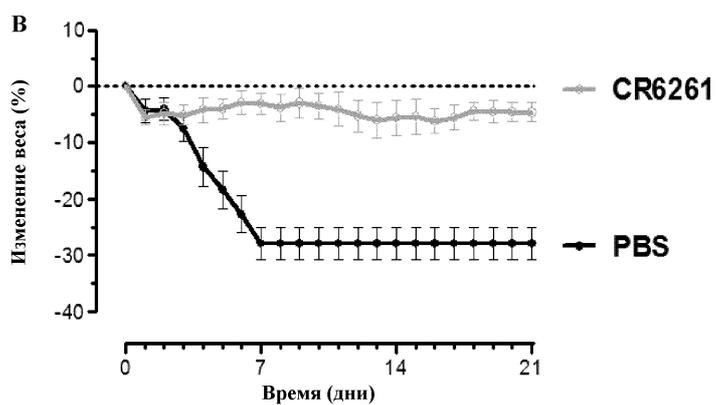
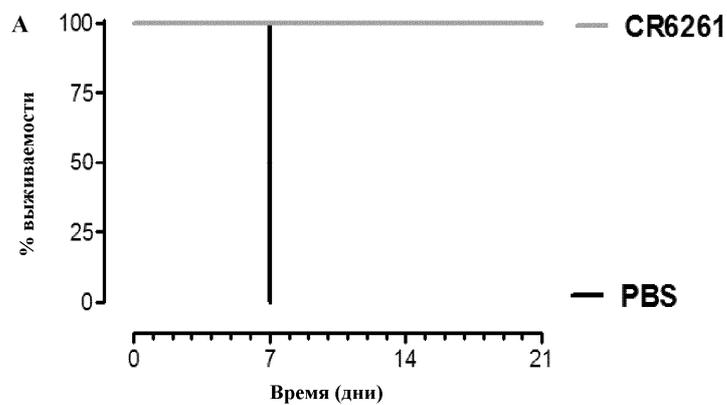


## Анализ стационарного состояния

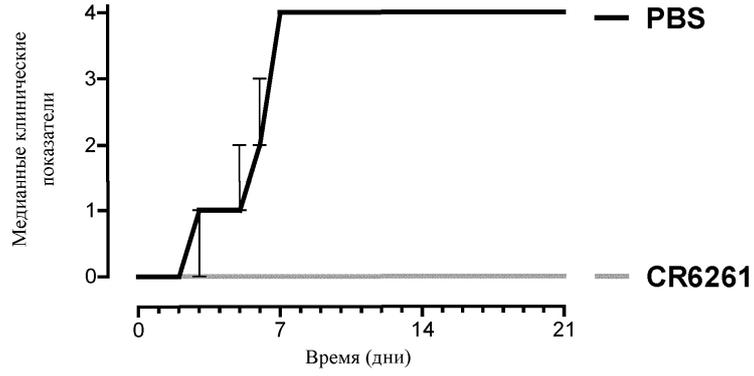
D



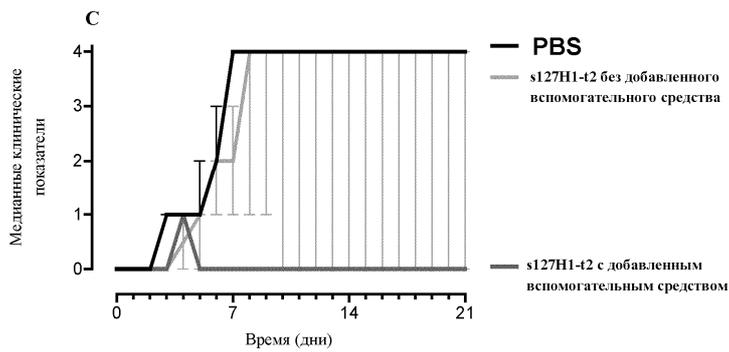
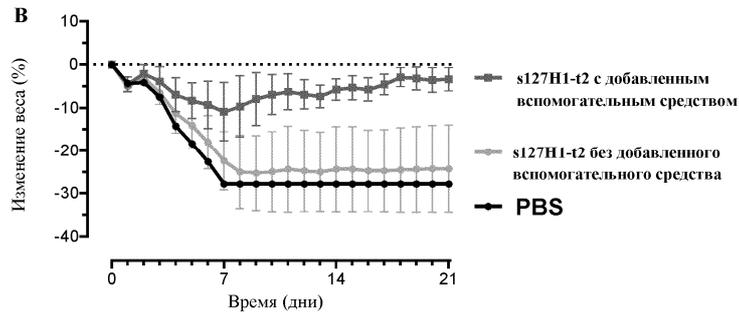
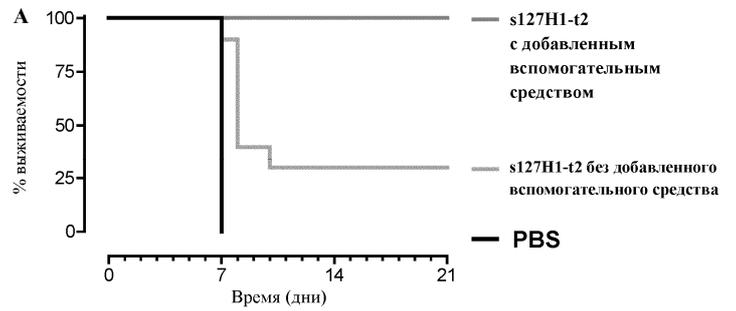
Фиг. 8



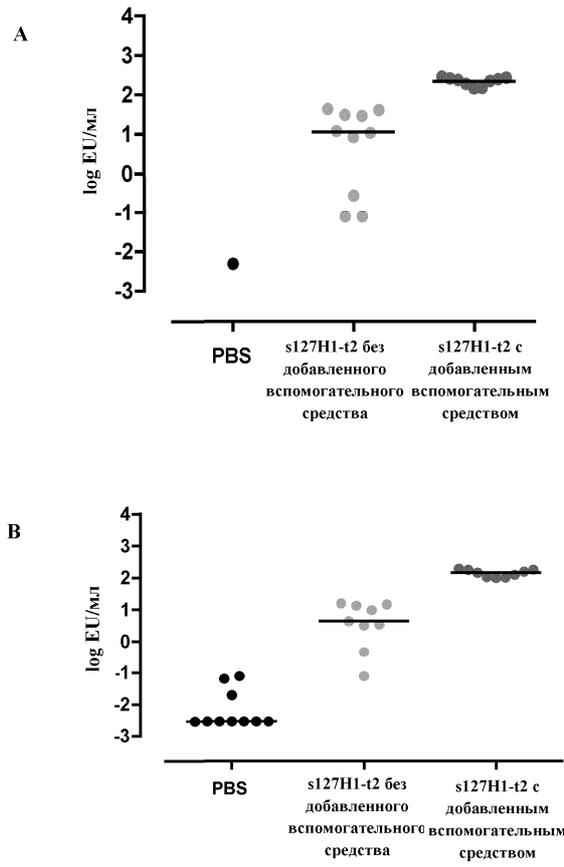
038400



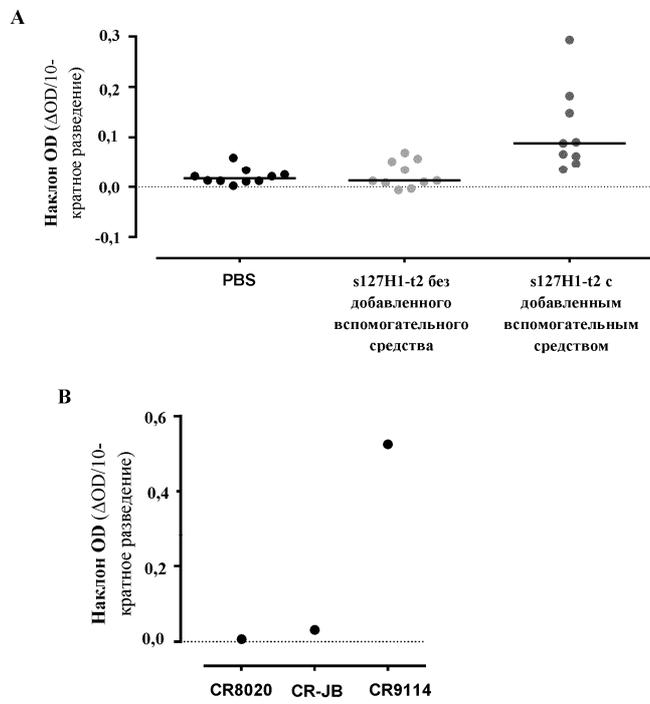
Фиг. 9



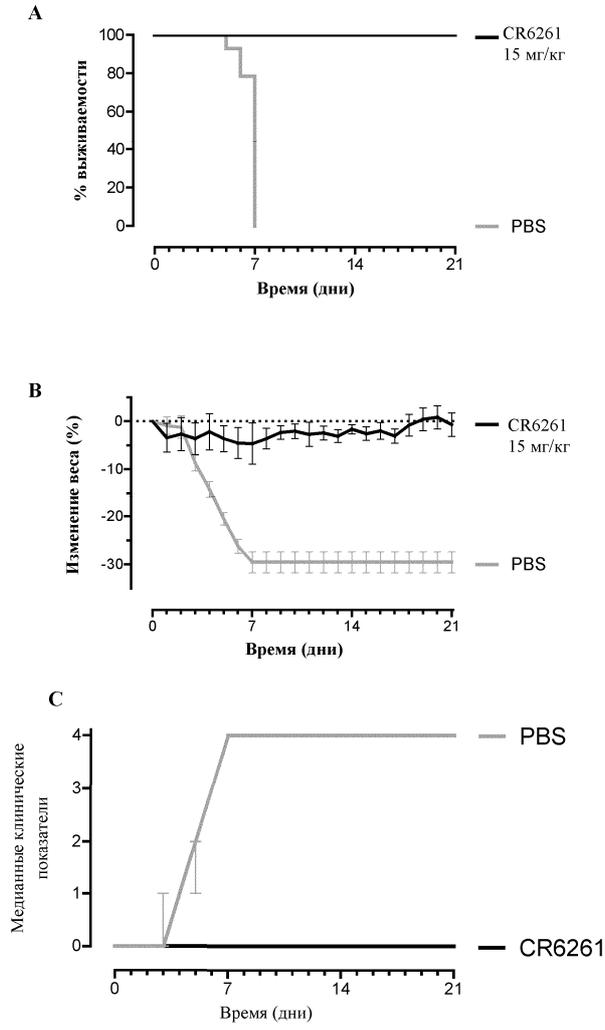
Фиг. 10



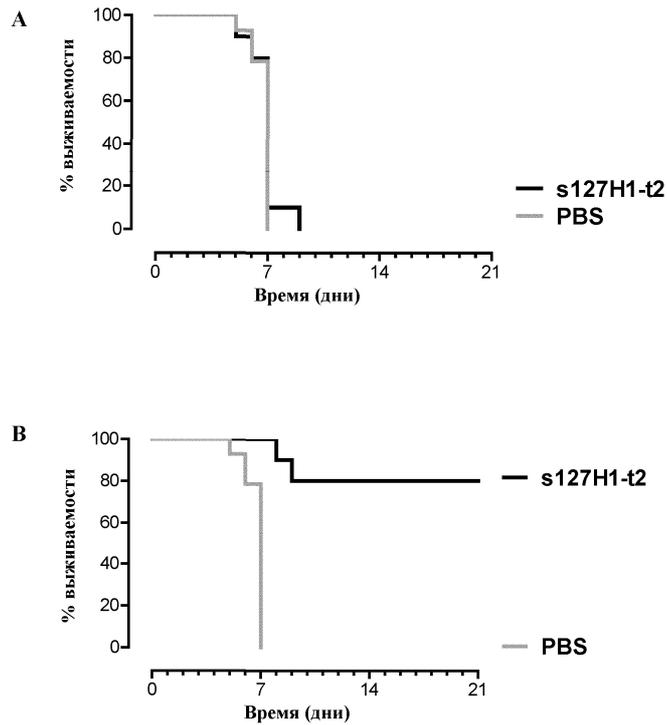
Фиг. 11

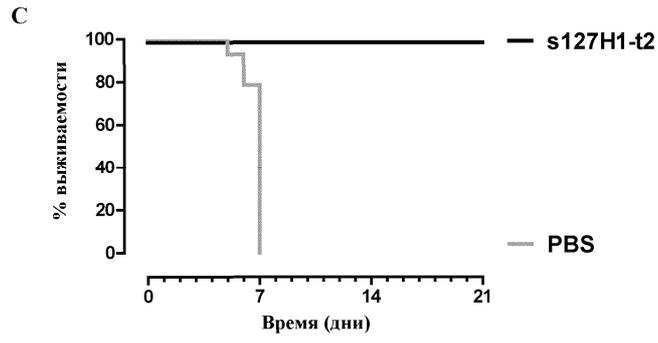


Фиг. 12

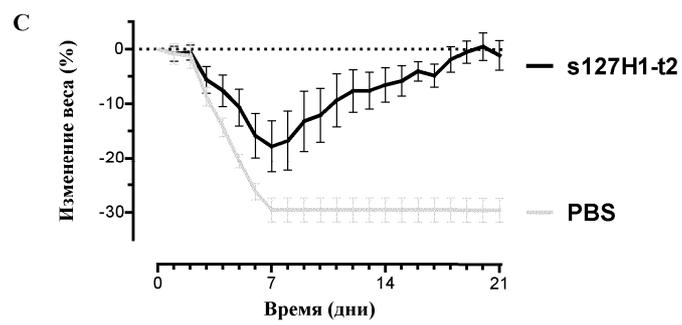
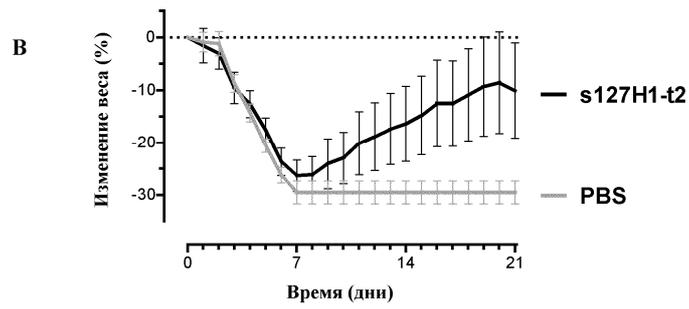
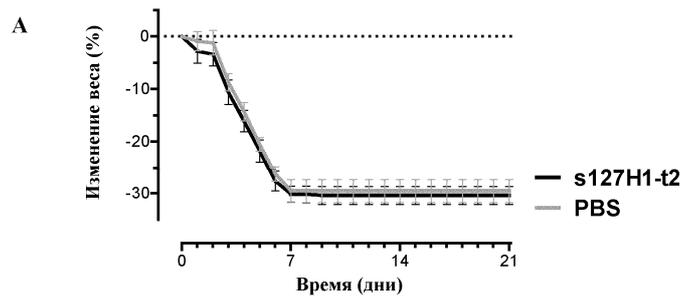


Фиг. 13

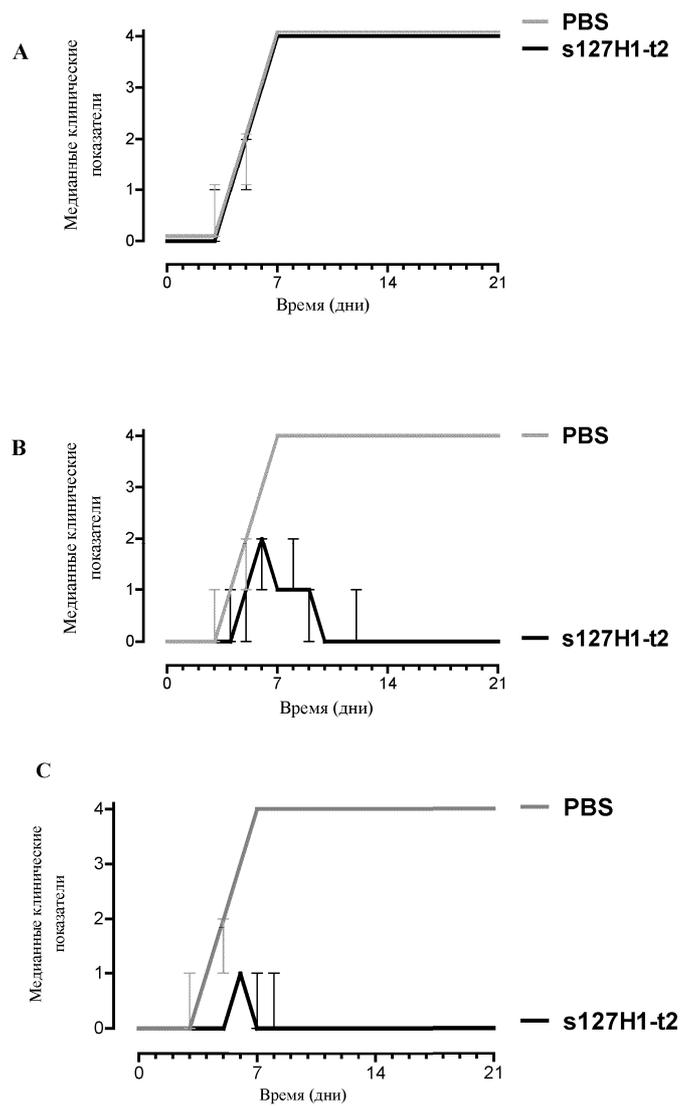




Фиг. 14



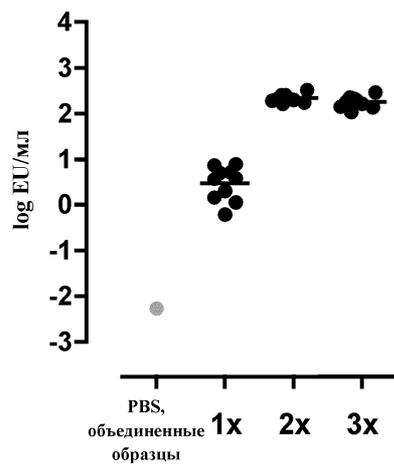
Фиг. 15



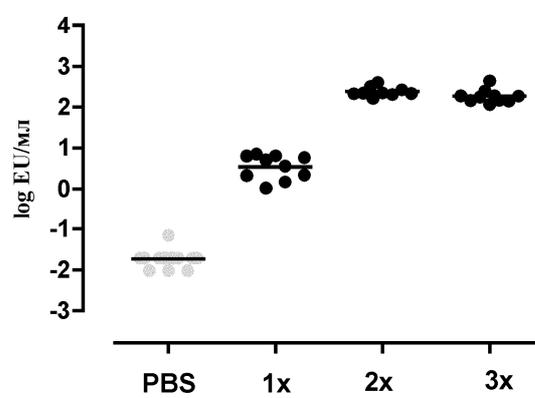
Фиг. 16

038400

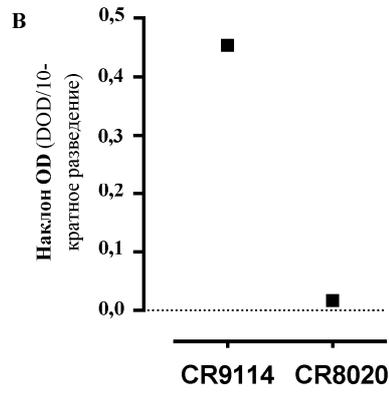
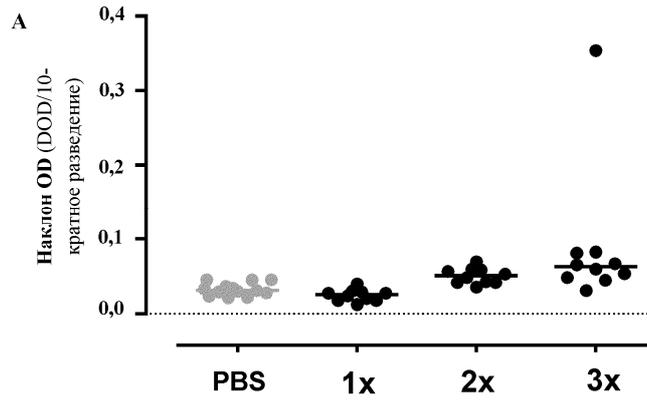
A



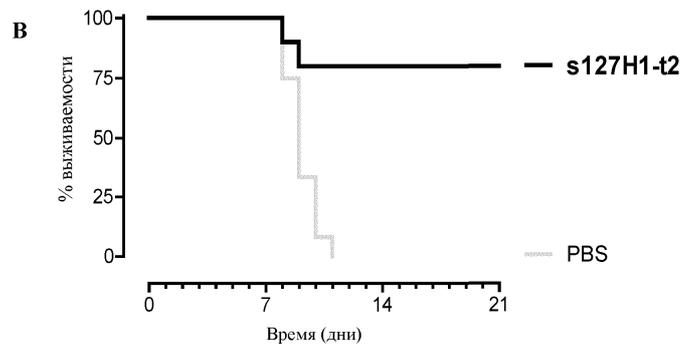
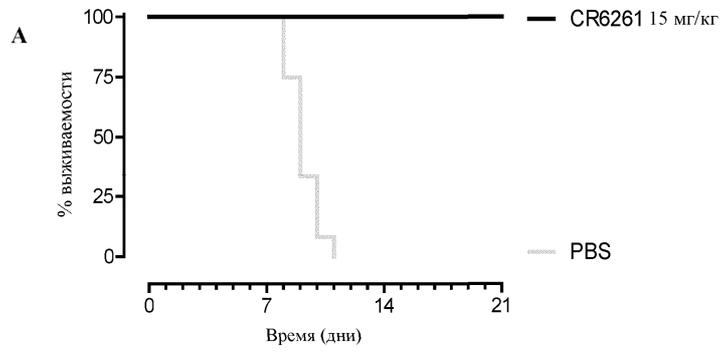
B

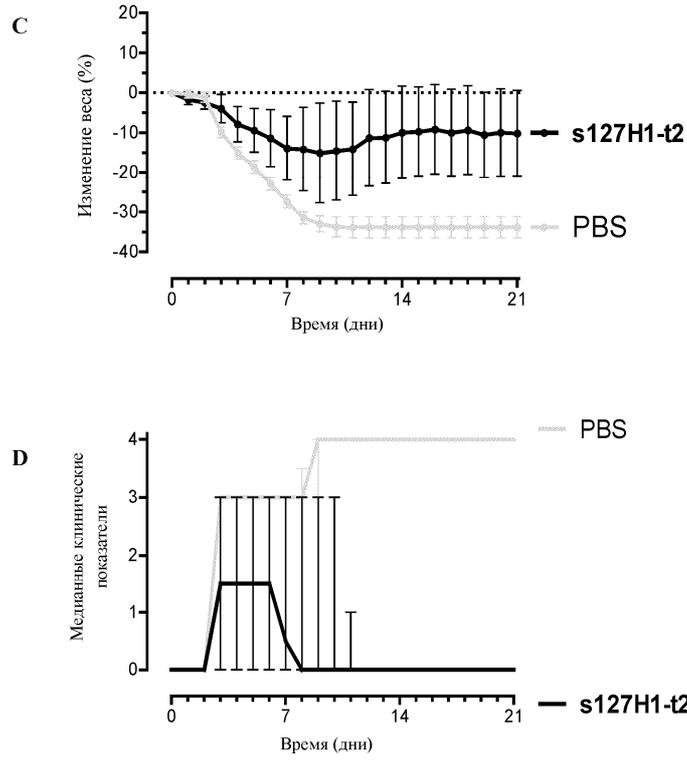


Фиг. 17

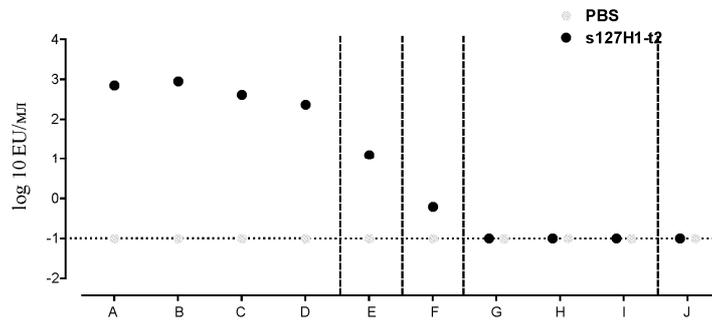


Фиг. 18



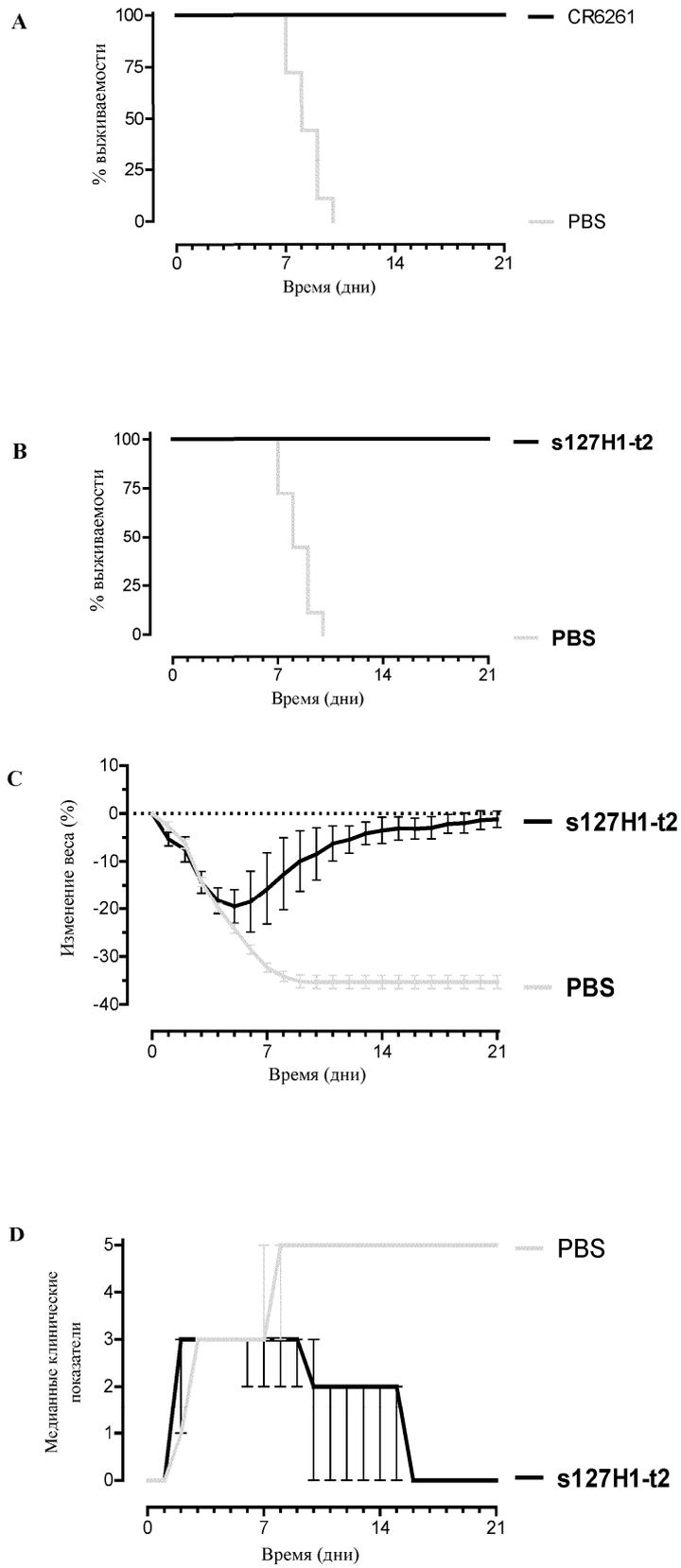


Фиг. 19



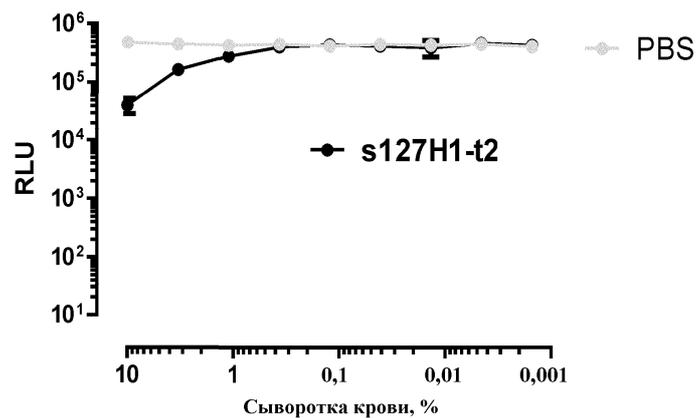
Код	Штамм
A	H1 A/Brisbane/59/2007
B	H1 A/California/07/09
C	H1 A/New Caledonia/20/1999
D	H1 A/Puerto Rico/8/1934
E	H5 A/Vietnam/1203/2004
F	H9 A/Hong Kong/ 1073/1999
G	H3 A/Brisbane/10/2007
H	H3 A/Wisconsin/67/2005
I	H3 A/Texas/50/2012
J	H7 A/Netherlands/219/03

Фиг. 20



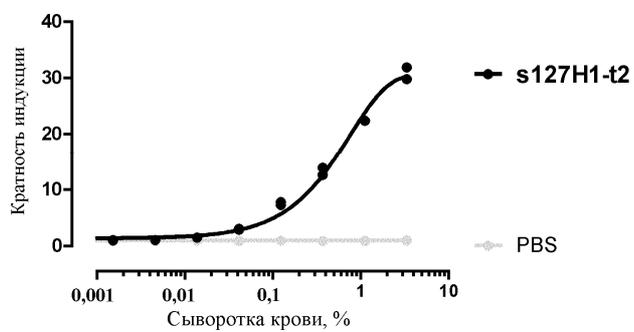
Фиг. 21

038400

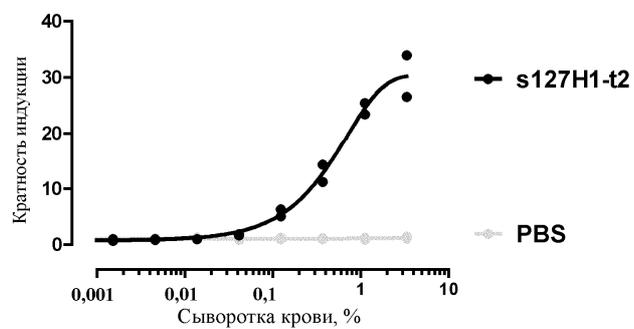


Фиг. 22

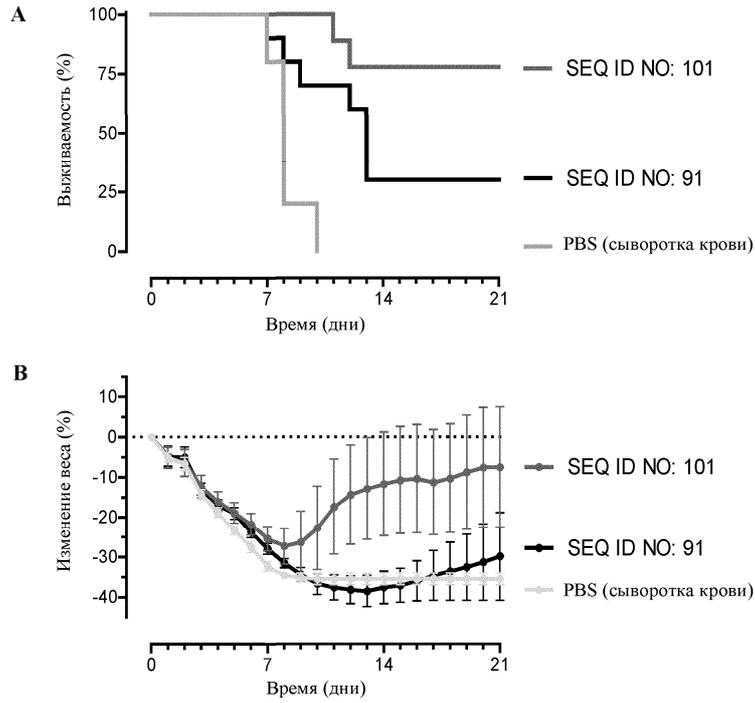
А Мишень: FL HA H5 A/Hong Kong/156/97



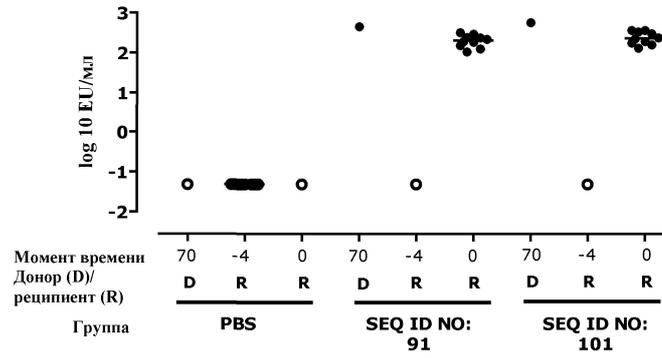
В Мишень: FL HA H1 A/Brisbane/59/2007



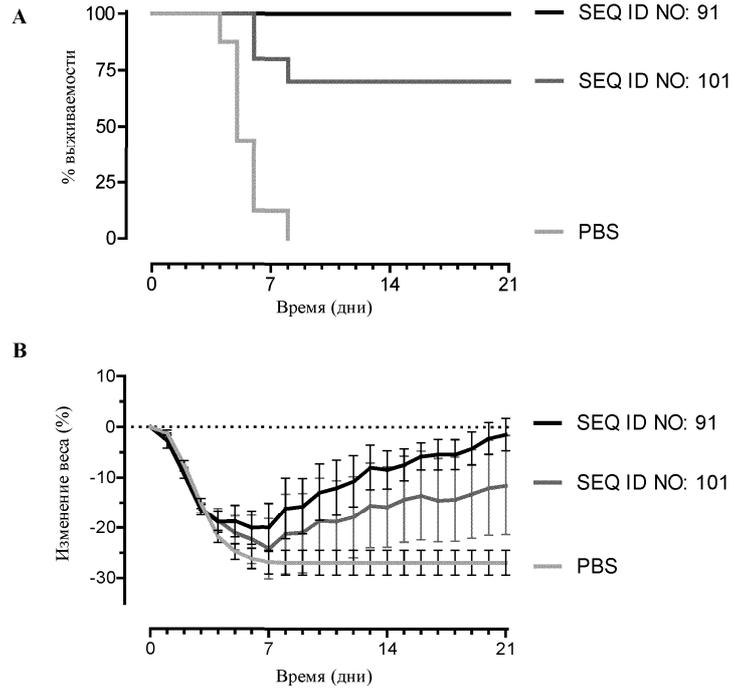
Фиг. 23



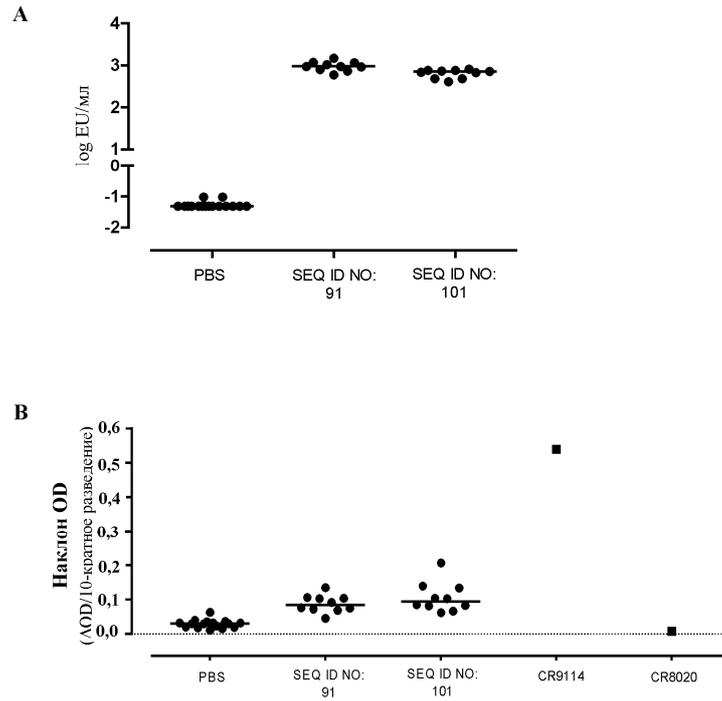
Фиг. 24



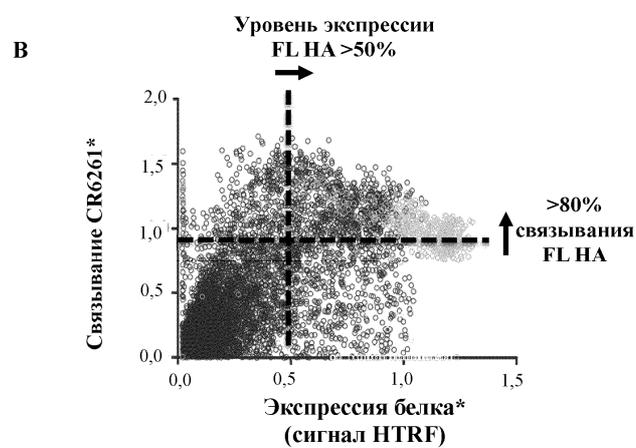
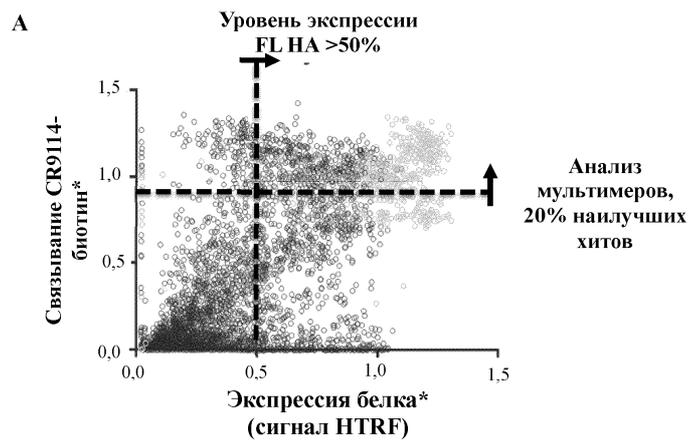
Фиг. 25



Фиг. 26

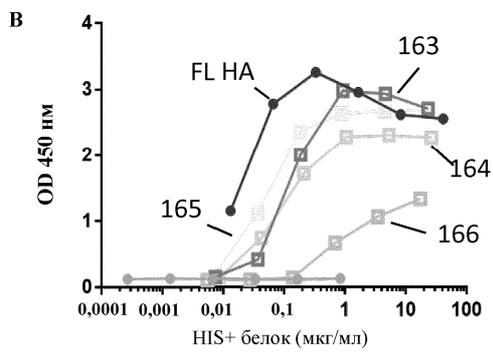
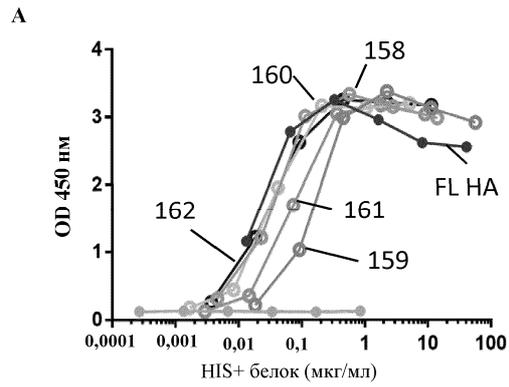


Фиг. 27

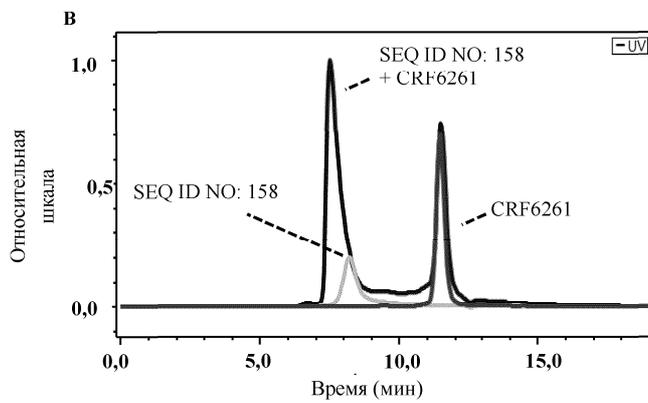
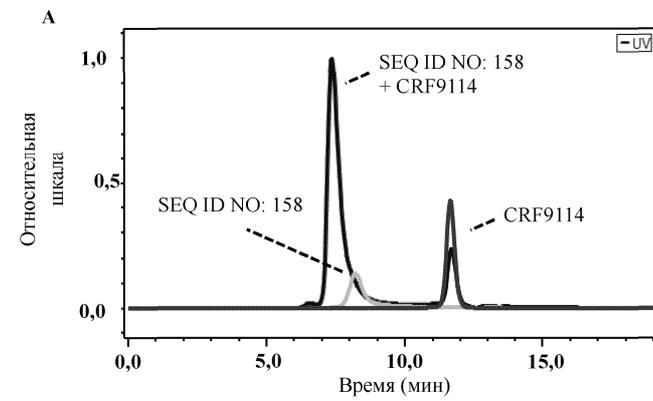


Фиг. 28

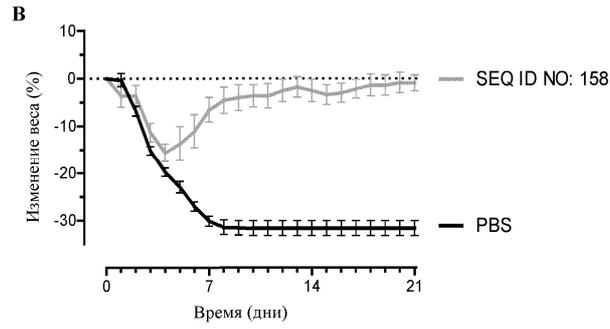
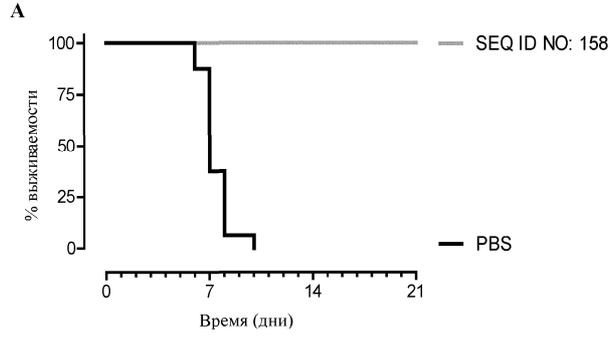
038400



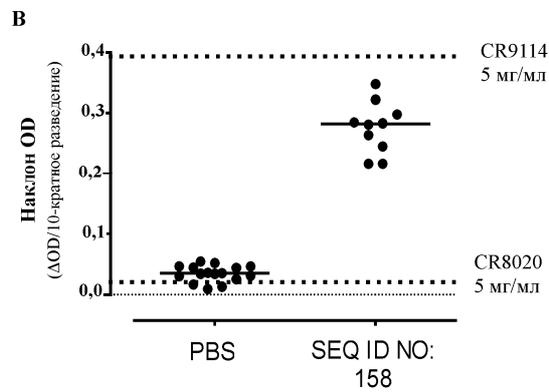
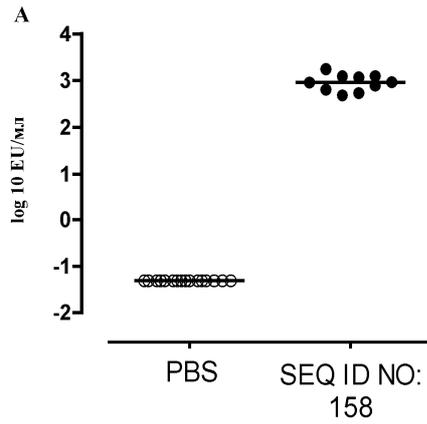
Фиг. 29



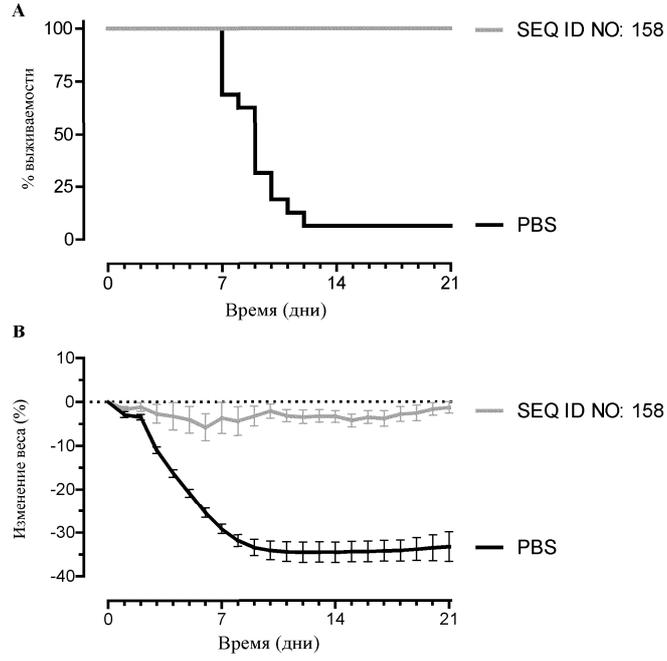
Фиг. 30



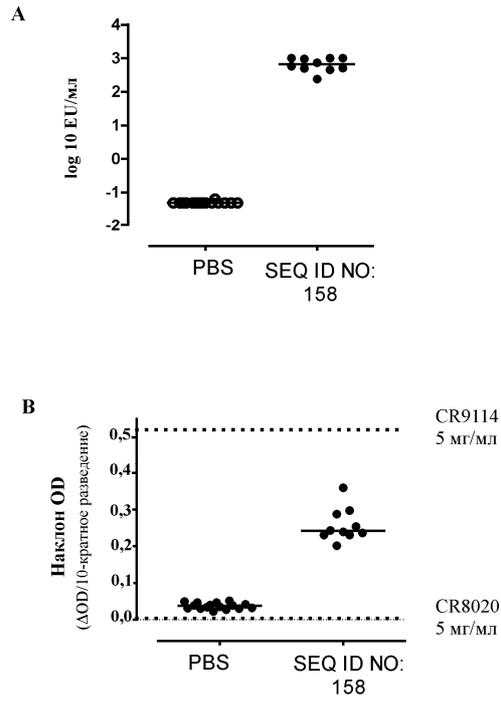
Фиг. 31



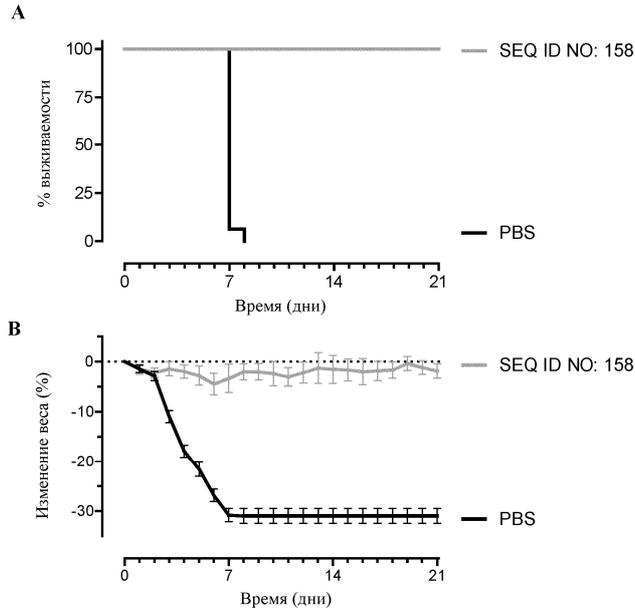
Фиг. 32



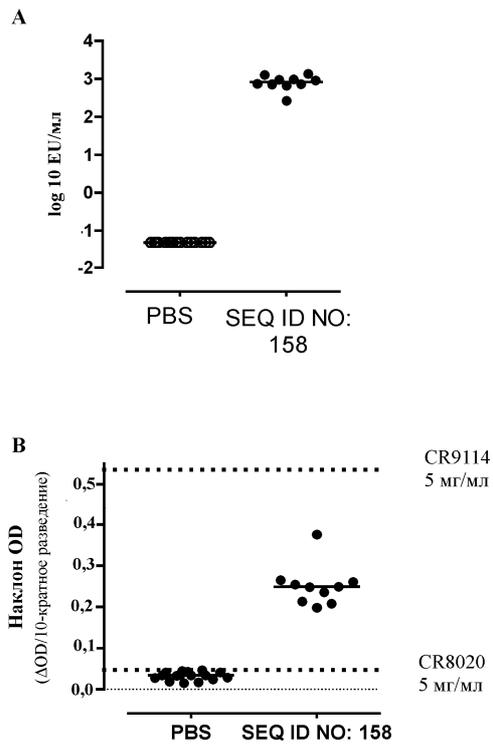
Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36

