

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290773 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.15

(22) Дата подачи заявки
2020.09.03

(51) Int. Cl. A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/896,244

(32) 2019.09.05

(33) US

(86) PCT/EP2020/074539

(87) WO 2021/043869 2021.03.11

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Йонгенелен Манди Антония
Катарина, Ричель Тина, Милдер
Фердинанд Якобус, Кинг Индиго, Сун
Ифань, Лангедейк Йоханнес Петрус
Мария, Бранденбург Бёррис (NL)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении представлены полипептиды стеблевого домена гемагглютинирина вируса гриппа группы 2, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные полипептиды, векторы, содержащие указанную нуклеиновую кислоту, и фармацевтические композиции, содержащие их, а также способы их применения, в частности, при предупреждении и/или лечении гриппозных вирусных инфекций.

A1

202290773

202290773

A1

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5 ВВЕДЕНИЕ

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

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

15 ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вирусы гриппа являются основными патогенами человека, вызывающими респираторное заболевание (обычно называемое "гриппом"), тяжесть которого варьирует в пределах от субклинической инфекции до первичной вирусной пневмонии, которая может привести к смерти. Клинические эффекты инфекции различаются в зависимости от вирулентности штамма вируса гриппа и воздействия, истории болезни, 20 возраста и иммунного статуса хозяина. По оценкам, ежегодно приблизительно 1 миллиард человек во всем мире подвергается инфицированию вирусом гриппа, что приводит к тяжелой болезни в 3-5 миллионах случаев и ориентировочно от 300000 до 500000 смертей, связанных с гриппом. Большую часть этих инфекций можно отнести к вирусам гриппа А, несущим подтипы Н1 или Н3 гемагглютенина, при меньшем вкладе 25 вирусов гриппа В, и, следовательно, их представителей обычно включают в сезонную вакцину. Современная практика иммунизации основана на ранней идентификации циркулирующих вирусов гриппа для обеспечения своевременного получения эффективной сезонной вакцины против гриппа. Помимо неизбежных трудностей в прогнозировании того, какие штаммы будут преобладать во время следующего сезона, 30 в неспособности современных вакцин предупредить заболеваемость и смертность также играют роль устойчивость к противовирусным препаратам и ускользание от иммунного ответа. Кроме того, возможность пандемии, вызванной высоковирулентным

штаммом вируса, происходящим из животных-резервуаров и реассортированным с увеличением распространения от человека к человеку, все еще представляет собой значительную и реальную угрозу для глобального здравоохранения.

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

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

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

Известно, что антитела, которые нейтрализуют вирус гриппа, направлены главным образом на гемагглютинин (HA). Гемагглютинин или HA представляет собой тримерный гликопротеин, который заякорен в вирусной мембране и имеет двойную функцию: он отвечает за связывание с рецепторами клеточной поверхности, содержащими сиаловую кислоту, а после поглощения он опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембраны, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитозоль

клетки-мишени. НА содержит крупный головной домен и меньший стеблевой домен. Стеблевой домен заякорен в вирусной мембране с помощью последовательности С-концевого трансмембранного домена. Белок подвергается посттрансляционному расщеплению с получением двух полипептидов НА — НА1 и НА2 (полную

5 последовательность называют НА0) (фиг. 1А, 1В). Мембранно-дистальный головной домен в основном образован из НА1, а мембранно-проксимальный стеблевой домен — главным образом из НА2. Расщепление молекулы-предшественника НА НА0 необходимо для активации инфекционности вируса, и распределение активирующих протеаз в хозяине является одной из детерминант патогенности вируса гриппа. НА

10 вирусов млекопитающих и непатогенных вирусов птиц расщепляются внеклеточно, что ограничивает их распространение в хозяевах тканями, где встречаются соответствующие протеазы. В то же время НА патогенных вирусов расщепляются внутриклеточно повсеместно встречающимися протеазами и поэтому обладают способностью инфицировать различные типы клеток и вызывать системные инфекции.

15 Причиной, по которой сезонная вакцина против гриппа должна обновляться каждый год, является значительная изменчивость вируса. В белке НА такая изменчивость особенно проявляется в головном домене, где антигенный дрейф и шифт привели к образованию больших количеств различных вариантов. Поскольку он также представляет собой зону, которая является иммунодоминантной, большинство

20 нейтрализующих антител направлены на данный домен, и такие антитела действуют путем препятствования связыванию с рецептором. Сочетанием иммунодоминантности и значительной изменчивости головного домена объясняется то, что инфицирование одним определенным штаммом не приводит к формированию иммунитета к другим штаммам: антитела, выработанные в результате первого инфицирования, распознают

25 лишь ограниченное число штаммов, близкородственных вирусу, вызвавшему первичную инфекцию.

Недавно полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона вируса гриппа, в которых отсутствует весь глобулярный головной домен гемагглютиниона вируса гриппа или существенная его часть, были описаны и были применены для формирования

30 иммунного ответа на один или несколько консервативных эпитопов полипептида стеблевого домена. Полагают, что эпитопы полипептида стеблевого домена являются менее иммуногенными, чем высокоиммуногенные области глобулярного головного домена, и поэтому отсутствие глобулярного головного домена в полипептиде стеблевого домена может обеспечить возможность развития иммунного ответа на один

или нескольких эпитопов полипептида стеблевого домена (Steel et al., 2010). Steel et al., таким образом, создали полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа посредством делеции аминокислотных остатков 53-276 из домена НА1 штаммов A/Puerto

Rico/8/1934 (H1N1) и A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) и замещения подвергнутой делеции

последовательности с помощью короткой гибкой линкерной последовательности:

GGGG. Вакцинация мышей конструкцией H3/НК68 не приводила к выработке

антисывороток, которые перекрестно реагировали с НА группы 1. Кроме того, как

объяснено в WO2013/079473, полипептиды стеблевого домена были нестабильными и

не принимали правильную конформацию, что доказано отсутствием связывания

антител, которые, как было ранее показано, связываются с консервативными эпитопами в полноразмерной стеблевой области НА дикого типа.

Bommakanti et al. (2010) описали полипептид на основе НА2, содержащий аминокислотные остатки 330-501 (НА2), 7-аминокислотный линкер (GSAGSAG),

аминокислотные остатки 16-55 из НА1, 6-аминокислотный линкер GSAGSA с

последующими остатками 290-321 из НА1, с мутациями V297T, I300E, Y302T и C305T

в НА1. В основе данной разработанной структуры лежала последовательность НА H3

(A/Hong Kong/1/1968). 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) был описан полипептид

стеблевого домена на основе НА из H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (H1NA0NA6). В этом

полипептиде был подвергнут делеции эквивалент аминокислотных остатков 48-288 и

были произведены мутации I297T, V300T, I302N, C305S, F392D, F395T и L402D.

Полипептиды на основе как H3, так и H1 экспрессировались в *E. coli*, и, следовательно,

в них отсутствовали гликаны, которые являются частью встречающихся в природе

белков НА.

У Corbett et al. (2019) описали тримеры стеблевых доменов НА H3 и H7 вируса гриппа А, представленные на самособирающихся наночастицах ферритина, которые

вызывают у мышей выработку защитных гомоподтипических антител. Несмотря на

свою иммуногенность, антигены НА, слитые с ферритином, также могут вызывать

нежелательные ответы против наночастиц-носителей, которые могут привести к

снижению иммунного ответа, направленного на НА, и увеличению продолжительности

их жизни после повторной иммунизации. Кроме того, уровни экспрессии и проблемы

очистки слитых белков НА-ферритин могут препятствовать получению большого

количества доз вакцины. Кроме того, доступность эпитопов НА (таких как участок

связывания с CR8020) вблизи поверхности таких наночастиц может снизить иммунный ответ на такие благоприятные консервативные поверхности НА.

До сих пор грипп по-прежнему является серьезным бременем для мировой системы здравоохранения, даже несмотря на то, что технология производства вакцины на основе выращенного на яйцах цельного инактивированного вируса гриппа были разработаны более 70 лет назад. Постоянный антигенный дрейф гемагглютинина (НА) вируса гриппа в сочетании с ответами с выработкой антител, специфичных к иммунодоминантному штамму, которые направлены на переменный головной домен НА, приводит в результате к тому, что эффективность традиционной вакцины варьирует в диапазоне от 10 до 60% и к необходимости сезонных обновлений штаммов вирусов, включенных в лицензированные вакцины. Более того, современные подходы по созданию вакцин обеспечивают минимальную защиту от пандемических штаммов вируса гриппа.

Потребность в улучшенной вакцине группы 2 стоит особенно остро, поскольку эффективность вакцины против H3N2 за последнее десятилетие составила в среднем лишь 33% (Belongia et al. (2016)), недавние штаммы H3N2 продемонстрировали повышенную вирулентность (Garten et al. (2017)), а вирусы H7 представляют собой одну из самых больших пандемических угроз, исходящих от несезонных штаммов.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении представлены новые мономерные и мультимерные, в частности тримерные, полипептиды, полученные из гемагглютинина (НА) вируса гриппа группы 2, при этом полипептиды содержат стеблевой домен НА вируса гриппа и не содержат глобулярную головную область и называются в данном документе полипептидами стеблевого домена гемагглютинина (НА) вируса гриппа или мини-НА. Полипептиды индуцируют клеточный и/или гуморальный иммунный ответ против по меньшей мере вирусов гриппа группы 2 при введении субъекту, в частности субъекту-

человеку. Полипептиды по настоящему изобретению являются термостабильными и презентируют консервативные эпитопы мембранно-проксимального стеблевого домена молекулы НА группы 2 иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, присутствующих в мембранно-дистальном головном домене.

5 Таким образом, в полипептидах стеблевого домена НА по настоящему изобретению часть первичной последовательности белка НА0, т. е. часть, составляющая головной домен, была подвергнута делеции, а оставшаяся аминокислотная последовательность была заново соединена непосредственно либо, в некоторых вариантах осуществления, посредством введения короткой гибкой
10 линкерной последовательности ("линкера") для восстановления непрерывности полипептидной цепи. Полученную аминокислотную последовательность далее модифицируют путем введения специфических модификаций, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части молекулы НА.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к мономерным
15 полипептидам стеблевого домена гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А, содержащим домены НА1 и НА2 НА вируса гриппа А группы 2, при этом указанные полипептиды стеблевого домена НА содержат аминокислотную последовательность, которая характеризуется следующим:

(i) делецией головной области из домена НА1;
20 (ii) модификацией тримеризационной области в домене НА2;
 (iii) по меньшей мере двумя цистеиновыми остатками, способными образовывать по меньшей мере один внутримonomерный цистеиновый мостик;
 и где в аминокислотной последовательности аминокислота в положении 355 представляет собой W;

25 где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида стеблевого домена НА соответствует нумерации H3 в соответствии с номенклатурой НА из Winter et al. (1981), что соответствует нумерации в полноразмерном НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к
30 полипептидам стеблевого домена гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А группы 2, содержащим домены НА1 и НА2, где указанные стеблевые полипептиды НА содержат аминокислотную последовательность, которая характеризуется:

(i) делецией головной области в домене НА1, при этом указанная делеция охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты,

соответствующей аминокислоте в положении 50, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 302, включительно;

(ii) модификацией тримеризационной области в домене НА2, предпочтительно модификацией тримеризационной области в С-спирали, при этом указанная

тримеризационная область содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 405, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 419, включительно;

(iii) цистеином в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422; или

цистеином в аминокислоте, соответствующей положению 311, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422; или цистеином в аминокислотном положении, соответствующем положению 308, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 418, которые образуют (способны образовывать) внутримonomерный дисульфидный мостик;

и где в аминокислотной последовательности аминокислота в положении 355 представляет собой W;

где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида стеблевого домена НА соответствует нумерации H3 в соответствии с номенклатурой НА из Winter et al., выше, что соответствует нумерации в полноразмерном НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было продемонстрировано, что новые полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа группы 2 по настоящему изобретению можно экспрессировать рекомбинантными методами с высокими уровнями экспрессии, они являются тримерными в надосадочной жидкости клеточной культуры в отсутствие дополнительных искусственных С-концевых тримеризационных доменов и/или имеют повышенную температуру плавления, что указывает на большую термостабильность. Кроме того, полипептиды стеблевого домена НА группы 2 по настоящему изобретению имитируют стеблевой домен полноразмерного НА группы 2, посредством стабильной презентации эпитопа связывающих стеблевой домен НА антител, связывающихся с НА группы 2, таких как CR9114 (которое описано в WO2013/007770) и/или CR8020 (которое описано в WO2010/130636).

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к мультимерному полипептиду стеблевого домена гемагглютинаина (НА) гриппа А, содержащему по

меньшей мере два мономера полипептида стеблевого домена НА, которые описаны в данном документе.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа группы 2.

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

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены способы индуцирования иммунного ответа на НА вируса гриппа группы 2 у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту полипептида стеблевого домена НА вируса гриппа, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением.

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

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа группы 2, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа, и/или векторы, содержащие указанные молекулы нуклеиновой кислоты, для применения в индуцировании иммунного ответа против вируса гриппа, в частности, для применения в качестве вакцины для предупреждения заболевания или патологического состояния, вызванного штаммом А вируса гриппа из филогенетической группы 2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1. **А.** Схематический обзор полипептидов по настоящему изобретению (нижняя фигура); **В.** Удаление головной области НА приводит к получению полипептидов стеблевых доменов по настоящему изобретению (мини-НА); **С.** Трехмерное представление мономера полипептида на основе стеблевого домена (мини-НА) по настоящему изобретению; **Д.** Схематическое изображение полипептида по настоящему изобретению (в частности, полипептида UFV180088).

ФИГ. 2. **А.** Уровни экспрессии белка в надосадочных жидкостях культур EXPI-CHO, определенные с помощью ОСТЕТ (антитело к С-метке); **В.** Результаты SEC-анализа надосадочных жидкостей клеточных культур EXPI-CHO, экспрессирующих конструкцию 180088 (левая панель), и SEC-MALS-анализа очищенной 180088; **С.** Связывание mAb CR9114 с очищенными полипептидами по результатам ELISA (значения EC_{50}); **Д.** Результаты анализа температурной стабильности очищенных полипептидов методом дифференциальной сканирующей флуориметрии.

ФИГ. 3. SEC-профили и результаты анализа элюирования надосадочных жидкостей клеточных культур EXPI-293, экспрессирующих несколько полипептидов стеблевых доменов по настоящему изобретению. **А.** SEC-профили полипептидов с возвратными мутациями в остатки дикого типа (WT); пунктирной линией показан стабилизированный эталон мини-НА без головного домена (UFV180141), черной линией показана последовательность мутантного мини-НА WT; **В.** Время элюирования (слева) и высота пика тримера (справа) SEC-профилей на панели А; **С.** SEC-профили полипептидов минимальной структуры и постадийное введение выбранных мутаций из UFV180088; пунктирной линией показан эталон минимальной структуры мини-НА (UFV180647), черной линией показан мутантный мини-НА; **Д.** Время элюирования и высота пика SEC-профилей на панели С.

ФИГ. 4. Стабильность тримерного полипептида стеблевого домена с межпротомерным дисульфидным мостиком и без него. **А.** Результаты SEC-анализа надосадочных жидкостей клеточных культур Expi293F (левая панель) во время сбора продукции и надосадочных жидкостей клеточных культур EXPI-CHO, экспрессирующих очищенные полипептиды после однонедельной инкубации при 4°C без (UFV180192) и с (UFV180141) введенными цистеиновыми остатками в положениях 398 и 408 (как указано в структурной модели мини-НА в верхней части данной фигуры); **В.** Температурная стабильность очищенных полипептидов, определенная методом дифференциальной сканирующей флуориметрии; **С.** Результаты SDS-PAGE-анализа чистоты белка в невосстанавливающих и восстанавливающих

условиях. Как видно, введенные цистеиновые остатки образуют межпротомерные дисульфидные мостики и повышают температурную стабильность.

5 **ФИГ. 5.** А. Уровни экспрессии белков и связывание с антителами, по результатам
определения с помощью AlphaLISA надосадочных жидкостей культур, у
экспрессированных посредством EXPI-293 полипептидов, которые
различаются в положениях 355 и 482. Значения определены с помощью
AlphaLISA и нормализованы к эталону (UFV161333); В. Экспрессия белка,
10 содержание тримеров и связывание с антителами, по результатам
определения с помощью AlphaLISA надосадочных жидкостей культур, у
экспрессированных посредством EXPI-293 полипептидов, мутантных по
положениям 380 и 432. Значения нормализованы к эталону (UFV170991); С. I.
Экспрессия белка, содержание тримеров и связывание с антителами, по
15 результатам определения с помощью AlphaLISA надосадочных жидкостей
культур, у полипептидов, экспрессируемых посредством EXPI-293,
мутантных по положению 435. Значения нормализованы к эталону
(UFV170611); С. II. Уровни экспрессии белка у конструкций UFV171004
(435N) и UFV171197 (435R), экспрессированных в надосадочных жидкостях
20 культур EXPI-CHO, по результатам определения с помощью с помощью
ОСТЕТ (левая панель) и SEC-анализа (правая панель). Изучение
характеристик в условиях *in vitro* у очищенных полипептидов (нижняя
панель): связывание с mAb CR9114 и mAb CT149 (ELISA, значения EC_{50}) и
температурная стабильность (дифференциальная сканирующая
25 флуориметрия, значения T_{m50} в °C); D. Уровни экспрессии белка у
полипептидов, мутантных по положению 388, по результатам ОСТЕТ- и SEC-
анализа надосадочных жидкостей культур EXPI-CHO.

30 **ФИГ. 6.** Схематическое представление удаления головного домена НА (НА1). Уровни
экспрессии, содержание тримеров и связывание с mAb, определенные с
помощью AlphaLISA надосадочных жидкостей клеточных культур, у
полипептидов, экспрессированных клетками EXPI-293. Все данные
нормализованы к эталонным структурам UFV161908 (А), UFV160653 (В) и
UFV160321 (С). А. В эталонной структуре (UFV161908) была удалена часть

головного домена, начинающаяся с аминокислоты в положении 46 до аминокислоты в положении 306 включительно, и два конца HA1 были соединены искусственным "GPGS-линкером". Показаны различные альтернативные положения разрезания для удаления головного домена HA (верхняя нить HA1) и прямые соединения концов HA1 (т. е. соединение N-концевого сегмента HA1 с C-концевым сегментом HA1 после удаления головного домена). В конструкции UFV170637 (темно-серым) головной домен, начинающийся с аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно, был подвергнут делеции аналогично предпочтительным конструкциям UFV180088, UFV180089 и UFV180090); **В.** Прямое соединение верхней и/или нижней нити HA1 после удаления головного домена HA; **С.** Соединение N-конца и C-конца HA1 посредством гомологичной линкерной последовательности, происходящей из головного домена. Все конструкции характеризуются делецией аминокислотной последовательности от аминокислоты в положении 46 до аминокислоты в положении 306 включительно.

ФИГ. 7. Уровень экспрессии и связывание с mAb, по результатам определения с помощью AlphaLISA надосадочных жидкостей культур, у экспрессированных посредством EXPI-293 тримерных полипептидов стеблевых доменов с мутациями для стабилизации В-петли. Все данные нормализованы к эталонным структурам UFV161686 (A), UFV161333 (B, C) и UFV171187 (D); **А.** Оптимизация и защита В-петли путем введения мотива гликозилирования в положение 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401; **В.** Введение остатков пролина путем точечных мутаций для стабилизации В-петли; **С.** Введение второго мотива гликозилирования (для N-связанного гликозилирования в положении 393) для дополнительной защиты В-петли; **Д.** Сочетание добавленных мотивов N-связанного гликозилирования (в положении 401 и 392 или 393) с пролиновыми заменами. Уровни экспрессии белка, определенные с помощью OCTET (антитело к His2); **Е.** На SEC-профилях надосадочных жидкостей культур клеток EXPI-293, экспрессирующих полипептиды, видно, что введение одного гликана (UFV180208) или двух гликанов и двух остатков пролина (UFV180217)

является достаточно приемлемым. Серым показаны время удерживания и высота пика, соответствующего тримерному полипептиду.

ФИГ. 8. Уровень экспрессии и связывание с mAb у экспрессированных посредством EXPI-СНО тримерных полипептидов стеблевого домена с мотивом N-связанного гликана в положении 38 и без него. **А.** Уровень экспрессии, определенный с помощью ОСТЕТ (антитело к С-метке), и связывание с антителами, по результатам определения с помощью ELISA (значения EC₅₀); **В.** Кривые разведения ELISA для UFV170282 (сплошная линия) и UFV170278 (пунктирная линия).

ФИГ. 9. Результаты анализа надосадочных жидкостей культур EXPI-293, экспрессирующих полипептиды с вариациями в положении введенного внутримономерного дисульфидного мостика.

Экспрессия белка и связывание с антителами, по результатам определения с помощью AlphaLISA, нормализованные к эталону UFV160595. **А.** Альтернативные цистеиновые остатки, введенные рядом с положением, присутствующим в эталонной конструкции UFV160595; **В.** Альтернативный второй дисульфидный мостик, введенный в область, расположенную ниже первого дисульфидного мостика.

ФИГ. 10. Результаты анализа надосадочных жидкостей культур EXPI-293, экспрессирующих полипептиды с вариациями в положении введенного межмономерного дисульфидного мостика. Экспрессия белка и связывание с антителами, по результатам определения с помощью AlphaLISA, нормализованные к эталонной структуре UFV170051.

ФИГ. 11. Результаты анализа надосадочных жидкостей культур EXPI-293, экспрессирующих растворимые тримерные полипептидные варианты с альтернативными С-концевыми усечениями (в положении 515 в UFV171272 и постадийно до положения 499 в UFV171280). **А.** SEC-профили с временем удерживания и высотой тримерного пика, обозначенными серым цветом; **В.** Связывание полипептидов с нейтрализующим антителом широкого спектра действия CR9114 и СТ149, определенное с помощью ОСТЕТ, где показаны

относительные значения K_{ON} у полипептидов по сравнению с эталоном UFV170991 (черным цветом).

ФИГ. 12. Результаты изучения характеристик *in vitro* у полипептидов по настоящему изобретению с заменами остатков в А-спирали от НЗ дикого типа (WT) в направлении Н1. **А.** Уровни экспрессии белков и связывание с антителами, по результатам определения с помощью AlphaLISA надосадочных жидкостей клеточных культур EXPI-293, содержащих экспрессированные полипептиды. Значения нормализованы к эталону (UFV161454); **В.** Уровни экспрессии белка в трех независимых надосадочных жидкостях культур EXPI-CHO, определенные с помощью ОСТЕТ (антитело к His2, левая панель) и SEC-MALS-анализа (правая панель). Результаты изучения характеристик *in vitro* очищенных полипептидов (нижняя панель): связывание с mAb CR9114 и СТ149 (ELISA, значения EC_{50}) и температурная стабильность (дифференциальная сканирующая флуориметрия, значения Tm_{50}).

ФИГ. 13. Результаты анализа надосадочной жидкости культуры клеток EXPI-293, экспрессирующих тримерные полипептиды стеблевого домена с поверхностными мутациями в стеблевом домене в направлении НА Н7. Содержание тримеров и связывание с антителами, определенные с помощью AlphaLISA. Все данные нормализованы к эталонной структуре UFV172561, содержащей мутации 379 и 381 А-спирали в направлении Н1 (**А**) или эталонной структуре UFV172562, содержащей остатки А-спирали НЗ дикого типа в положениях 379 и 381 (**В**). В SEC-профилях эталоны обозначены пунктирной линией.

ФИГ. 14. Результаты SEC-анализа надосадочных жидкостей клеточных культур EXPI-293, экспрессирующих полипептиды, полученные из различных штаммов НЗ группы 2, содержащие соответствующие структурные элементы для получения растворимых тримерных полипептидов стеблевого домена. **А.** SEC-профили полипептидов мини-НА, содержащих структурные элементы набора I и основанные на A/Hong Kong/1/1968, A/Wisconsin/67/05 или A/Singapore/INFIMH/16/0019/2016 (пик тримера обозначен значком 'Т'); **В.** SEC-профили полипептидов, содержащих дополнительные стабилизирующие

мутации в В-петле: структура I (пунктирной линией), структура II (серым) и структура III (черным).

ФИГ. 15. Нумерация аминокислотных положений в A/Hong Kong/1/1968 H3 дикого типа (wt A/НК/1/1968) и в полученных из H3 структурах мини-НА UFV180088, UFV180089 и UFV180090 в соответствии с нумерацией H3 из Winter *et al.* (1981).

ФИГ. 16. Управляемая аденовирусом (Ad26.FLU.004) экспрессия и сворачивание UFV180480 (UFV18088 с нативным трансмембранным доменом). Результаты FACS-анализа клеток MRC-5, трансдуцированных посредством **A)** Ad26.Empty (10000 в. ч./клетка, отрицательный контроль) и **B)** Ad26.FLU.004 (5000 в. ч./клетка). Трансдуцированные клетки MRC-5 окрашивали антителом CR9114; **C.** Вестерн-блоттинг лизатов клеток MRC-5, трансдуцированных посредством либо Ad26.FLU.004 (5000 в. ч./клетка), либо Ad26.Empty (5000 в. ч./клетка). В качестве положительного контроля загружали UFV180088 (200 нг/лентка). Все образцы прогоняли в невосстанавливающих (дорожка 1-3) или восстанавливающих (дорожка 4-6) условиях. Для детекции экспрессированного мини-НА использовали антитело CR9114.

ФИГ. 17. Результаты изучения характеристик *in vivo* полипептидов UFV170278, полипептида, который содержит мотив 38-NAT-40 дикого типа для N-связанного гликозилирования, и UFV170282, полипептида, в котором данный гликановый мотив был подвергнут нокауту с помощью точечной мутации по типу замены T40I. **A.** Титры антител, специфичных к стеблевому домену НА FL H3 A/Hong Kong/1/1968, через 4 недели после третьей иммунизации мышей полипептидами по настоящему изобретению или PBS. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе. **B.** *Левые панели:* доля выживших мышей в течение периода последующего наблюдения после контрольного заражения посредством A/Hong Kong/1/1968 H3N2, иммунизированных указанными полипептидами по настоящему изобретению или PBS; верхняя панель — UFV170278, нижняя панель — UFV170282. *Правые панели:* относительная масса тела мышей в течение периода последующего наблюдения после контрольного заражения

посредством A/Hong Kong/1/1968 H3N2, иммунизированных указанными полипептидами по настоящему изобретению или PBS; верхняя панель — UFV170278, нижняя панель — UFV170282. Изменение относительной массы тела выражали относительно дня 0. Совокупную потерю массы тела на протяжении периода последующего наблюдения определяли путем расчета площади под кривой (AUC). Планки погрешностей обозначают 95% доверительный интервал.

ФИГ. 18. Результаты изучения характеристики *in vivo* иммуногенности полипептидов UFV180088, UFV180089 и UFV180090 по настоящему изобретению на интактной мышинной модели. **А.** Титры антител, специфичных к стеблевому домену HA A/Hong Kong/1/1968 H3 FL, после одной (1 х), двух (2 х) или трех (3 х) иммунизаций мышей полипептидами по настоящему изобретению или PBS. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе. **В** Титры антител к HA A/Hong Kong/1/1968 H3 FL, A/Texas/50/2012 H3 и A/Netherlands/219/2003 H7 после одной (1 х), двух (2 х) или трех (3 х) иммунизаций мышей полипептидами по настоящему изобретению или PBS. Горизонтальная линия в каждой группе обозначает медианное значение в группе. Пунктирная линия обозначает LLOQ, при этом незакрашенными обозначениями показаны значения в LLOQ.

ФИГ. 19. Результаты изучения характеристики *in vivo* полипептидов UFV180088, UFV180089 и UFV180090 по настоящему изобретению на интактной мышинной модели смертельного заражения H3N2. *Левые панели:* доля выживших мышей в течение периода последующего наблюдения после контрольного заражения посредством A/Hong Kong/1/1968 H3N2, иммунизированных указанными полипептидами по настоящему изобретению или PBS; верхняя панель — UFV180088, средняя панель — UFV180089 и нижняя панель — UFV180090. *Правые панели:* относительная масса тела мышей в течение периода последующего наблюдения после контрольного заражения посредством A/Hong Kong/1/1968 H3N2, иммунизированных указанными полипептидами по настоящему изобретению или PBS. Изменение относительной массы тела выражали относительно дня 0. Совокупную потерю массы тела на протяжении периода последующего

наблюдения определяли путем расчета площади под кривой (AUC). Планки погрешностей обозначают 95% доверительный интервал. Интактная мышьяная модель смертельного заражения H7N9.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Ниже даны определения терминов, используемых в настоящем изобретении.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую из двадцати встречающихся в природе (или "стандартных") аминокислот или их вариантов, таких как, например, D-пролин (D-энантиомер пролина), или любые варианты, которые не обнаруживаются в природе в белках, такие как, например, норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают особыми свойствами, как, например, цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который образует цикл с полипептидным остовом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В таблице 7 показаны сокращения и свойства стандартных аминокислот.

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

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

Вирусы гриппа обычно классифицируются на типы вируса гриппа: роды А, В и С. Термин "подтип вируса гриппа", используемый в данном документе, относится к вариантам вируса гриппа А, которые характеризуются комбинациями поверхностных белков вируса гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N). В соответствии с настоящим изобретением подтипы вируса гриппа могут быть названы по их номеру H, как,

например, "вирус гриппа, содержащий НА подтипа НЗ", "вирус гриппа подтипа НЗ" или "вирус гриппа НЗ", или по комбинации номера Н и номера N, как, например, "подтип НЗN2 вируса гриппа" или "НЗN2". Термин "подтип" включает, в частности, все отдельные "штаммы" в пределах каждого подтипа, которые, как правило, образуются в результате мутаций и демонстрируют различные патогенные профили, в том числе природные изоляты, а также искусственные мутанты или реассортанты и т. п. Такие штаммы также можно называть различными "изолятами" подтипа вируса.

Соответственно, используемые в данном документе термины "штаммы" и "изоляты" можно использовать взаимозаменяемо. Существующая номенклатура штаммов или изолятов вируса гриппа человека включает тип (род) вируса, т. е. А, В или С, географическое место первого выделения, номер штамма и год выделения, обычно с описанием антигенов НА и NA, приведенным в скобках, например, А/Moscow/10/00 (НЗN2). Штаммы, отличные от человеческих, также включают в свою номенклатуру хозяина, из которого они происходят.

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

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

Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекул ДНК (например, кДНК или геномной ДНК) и молекул РНК (например, мРНК), а также аналогов ДНК и РНК, полученных с использованием аналогов нуклеотидов.

Нуклеиновая кислота может быть однонитевой или двухнитевой. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы химически или биохимически или могут содержать неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, как будет без труда понятно специалистам в данной области техники. Такие модификации включают, например, метки, метилирование, замену одного или нескольких

встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, модификации межнуклеотидных связей, такие как незаряженные связи (например, метилфосфонатные, фосфотриэфирные, фосфорамидатные, карбаматные и т. д.), заряженные связи (например, фосфотиоатные, фосфодитиоатные и т. д.), подвешенные фрагменты (например, полипептиды), интеркаляторы (например, акридин, псорален и т. д.), хелатирующие вещества, алкилирующие вещества и модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т. д.). Упоминание последовательности нуклеиновой кислоты охватывает комплементарную ей последовательность, если не указано иное. Таким образом, упоминание молекулы нуклеиновой кислоты с конкретной последовательностью следует понимать как охватывающее комплементарную ей нить с ее комплементарной последовательностью. Комплементарная нить также применима, например, для антисмысловых терапевтических средств, гибридизационных зондов и праймеров для ПЦР.

Используемая в данном документе нумерация аминокислот в НА основана на нумерации H3, описанной у Winter et al. (1981). Нумерация аминокислотных остатков или аминокислотных положений, таким образом, относится к нумерации в полноразмерном НА H3 (в частности, к нумерации аминокислотных положений в A/Aichi/2/68), описанной и показанной на фиг. 2 у Winter et al. (1981). Таким образом, нумерация основана на нумерации в полноразмерном НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1). Нумерация, в частности, относится к нумерации аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. Например, выражения "аминокислота в положении 392" или "аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 392" (которые используются взаимозаменяемо во всей настоящей заявке) относятся к аминокислотному остатку, находящемуся в положении 392 согласно нумерации H3 из Winter et al. (1981). Следует отметить, что, поскольку в полипептидах по настоящему изобретению часть домена (головного домена) HA1 была подвергнута делеции, нумерация, применяемая в данном документе, не обязательно относится к фактическим положениям аминокислот в полипептидах стеблевого домена HA по настоящему изобретению, но вместо этого относится к положению указанной аминокислоты в полноразмерной молекуле HA (т. е. без делеции в головном домене). Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что эквивалентные аминокислоты (т. е. аминокислоты, соответствующие аминокислоте в конкретном положении в SEQ ID NO: 1) в других штаммах и/или подтипах вируса гриппа и в

полипептидах стеблевого домена по настоящему изобретению можно определить с помощью выравнивания последовательностей.

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

"Полипептид стеблевого домена НА" относится к полипептиду, полученному из НА, который не содержит головной домен гемагглютинина (НА), встречающегося в природе (или дикого типа).

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

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

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

Гемагглютинин (НА) является основным гликопротеином оболочки вирусов гриппа, который представляет собой основную мишень для нейтрализующих антител. Гемагглютинин имеет две главные функции в ходе процесса проникновения. Во-первых,

гемагглютинин опосредует прикрепление вируса к поверхности клеток-мишеней благодаря взаимодействию с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту. Во-вторых, после эндоцитоза вируса гемагглютинин в дальнейшем инициирует слияние вирусной и эндосомальной мембран с высвобождением вирусного генома в цитоплазму клетки-мишени. НА содержит крупный эктодомен из ~ 500 аминокислот, который расщепляется ферментами хозяина с образованием 2 полипептидов (НА1 и НА2), остающихся соединенными дисульфидной связью. Большая часть N-концевого фрагмента (домена НА1, ~320-330 аминокислот) образует мембранно-дистальный глобулярный "головной домен", который содержит рецепторсвязывающий участок и большинство детерминант, распознаваемых антителами, нейтрализующими вирус. Меньшая С-концевая часть (домен НА2, ~180 аминокислот) образует стеблевидную структуру (стеблевой домен), которая заякоривает глобулярный домен на клеточной или вирусной мембране. Степень идентичности последовательностей между подтипами является меньшей для полипептидов НА1 (34% - 59% идентичность между подтипами), чем для полипептидов НА2 (51% - 80% идентичность). Наиболее консервативная область представляет собой последовательность вблизи участка расщепления протеазой, в частности, 23 N-концевые аминокислоты НА2, чья последовательность является консервативной у всех подтипов вируса гриппа А (Logieau et al., 2010). Часть этой области доступна в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице НА (НА0), но становится недоступной после расщепления НА0 на НА1 и НА2.

Большинство нейтрализующих антител связываются с петлями, которые окружают рецепторсвязывающий участок, и тем самым препятствуют связыванию с рецептором и прикреплению. Так как эти петли являются высоковариабельными, большинство антител, нацеленных на эти области, являются штаммоспецифическими, что объясняет то, почему существующие вакцины вызывают выработку такого ограниченного штаммоспецифического иммунитета. Были созданы полностью человеческие моноклональные антитела к гемагглютинину вируса гриппа с широким спектром перекрестно-нейтрализующей активности, такие как, например, CR6261 (WO2008/028946). Функциональный и структурный анализ показал, что эти антитела препятствуют процессу слияния мембран и направлены на высококонсервативные эпитопы в стеблевом домене белка НА вируса гриппа группы 1 (Throsby et al., 2008; Ekiert et al. 2009, WO 2008/028946). После идентификации CR9114 (как описано в WO2013/007770), которое перекрестно реагирует со многими молекулами НА группы 1 и 2, стало ясно, что в иммунной системе человека можно вызвать выработку

нейтрализующих антител очень широкого спектра действия к вирусам гриппа. Однако, с учетом необходимости в схеме ежегодной вакцинации, выработка таких антител после инфицирования или вакцинации (сезонными) вирусами гриппа подтипов Н1 и/или Н3, по-видимому, не всегда вызывается и достигает защитного уровня.

5 В соответствии с настоящим изобретением предусмотрены новые полипептиды стеблевого домена НА, которые имитируют специфические эпитопы, например, антитела CR9114 (содержащего вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 7 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 8), и/или CR8020 (содержащего вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 6). Полипептиды по настоящему изобретению можно применять для выработки связывающихся с вирусом гриппа и/или нейтрализующих вирус гриппа антител, предпочтительно, перекрестно связывающихся и/или перекрестно
10 нейтрализующих антител, при введении *in vivo* в отдельности либо в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения. Под "перекрестно связывающимися и/или перекрестно нейтрализующими антителами"
15 подразумевают антитела, которые способны связываться и/или нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять различных подтипов вирусов гриппа А из филогенетической группы 2, или антитела, которые способны связываться и/или нейтрализовать по меньшей мере один вирус гриппа группы 1 и по меньшей мере один вирус гриппа группы 2.
20

Полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа, стабильно презентирующие эпитопы антител CR6261 и/или CR9114, ранее были описаны в WO2013/079473. По меньшей мере некоторые из этих полипептидов стеблевого домена НА были способны стабильно презентировать эпитоп для CR6261 и/или CR9114 и, как показано, были
25 иммуногенными у мышей. Дополнительные полипептиды стеблевого домена НА, способные стабильно презентировать эпитоп для CR6261 и/или CR9114, были описаны в WO2014/191435, WO2016/005480 и WO2016/005482. Такие полипептиды стеблевого домена основаны на НА группы 1 вирусов гриппа А и индуцируют иммунный ответ только против вирусов гриппа А группы 1.

30 В исследовании, которое привело к созданию настоящего изобретения, было показано, что модификации, которые были введены в полипептиды стеблевого домена НА группы 1, не привели к получению стабильных и тримерных полипептидов стеблевого домена при применении НА вирусов гриппа группы 2.

В настоящем изобретении теперь представлены полипептиды стеблевого домена
 HA вируса гриппа группы 2, содержащие новые модификации, при этом такие
 полипептиды могут хорошо экспрессироваться в клетках млекопитающих, являются
 тримерными (например, при измерении с помощью AlphaLISA и SEC) и

5 термостабильными (например, при измерении, например, методом динамической
 сканирующей флуориметрии/дифференциальной сканирующей калориметрии
 (DSF/DSC)). Кроме того, было показано, что полипептиды стеблевого домена вируса
 гриппа группы 2 по настоящему изобретению индуцируют выработку нейтрализующих
 антител *in vivo*. Кроме того, аффинность всех протестированных нейтрализующих
 10 антител широкого спектра действия (bnAb) к полипептидам по настоящему
 изобретению составляет менее 1 нМ (по результатам измерения с помощью Octet и
 ELISA), что сходно с аффинностью антител к полноразмерному HA, что четко
 демонстрирует, что полипептиды имитируют стеблевой домен нативного
 полноразмерного HA. Кроме того, новые полипептиды стеблевого домена HA могут
 15 содержать, но не обязательно, любые искусственные линкеры, метки или N-, C-
 концевые тримеризационные домены.

Таким образом, в первом аспекте в настоящем изобретении представлены
 мономерные полипептиды стеблевого домена гемагглютиниона (HA) вируса гриппа А,
 содержащие домены HA1 и HA2 HA вируса гриппа А группы 2, при этом указанные
 20 полипептиды стеблевого домена HA содержат аминокислотную последовательность,
 которая характеризуется следующим:

(i) делецией головной области из домена HA1;
 (ii) модификацией тримеризационной области в домене HA2;
 (iii) по меньшей мере двумя цистеиновыми остатками, способными
 25 образовывать по меньшей мере один внутримомерный цистеиновый мостик;
 и где в аминокислотной последовательности аминокислота в положении 355
 представляет собой W;

где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной
 последовательности полипептидов стеблевого домена HA соответствует нумерации H3
 30 в соответствии с номенклатурой HA из Winter et al., что соответствует нумерации в
 полноразмерном HA эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, в настоящем изобретении представлены полипептиды
 стеблевого домена HA (т. е. полипептиды HA без головного домена), содержащие
 модификацию тримеризационной области в домене HA2, предпочтительно

модификацию в С-спирали, и по меньшей мере 2 цистеиновых остатка, образующие внутримonomерный дисульфидный мостик; где в аминокислотной последовательности аминокислота в положении 355 представляет собой W; и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептидов стеблевого домена HA соответствует нумерации H3 в соответствии с номенклатурой HA из Winter et al. на основе нумерации полноразмерного HA эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены мономерные полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа А, содержащие домены HA1 и HA2 HA вируса гриппа А группы 2, при этом указанные полипептиды стеблевого домена HA содержат аминокислотную последовательность, которая характеризуется следующим:

- (i) делецией головной области из домена HA1;
- (ii) модификацией тримеризационной области в домене HA2;
- (iii) по меньшей мере двумя цистеиновыми остатками, способными образовывать по меньшей мере один внутримonomерный цистеиновый мостик; и где полипептиды содержат мутацию по типу замены аминокислоты в положении 355 на W;

где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептидов стеблевого домена HA соответствует нумерации H3 в соответствии с номенклатурой HA из Winter et al., что соответствует нумерации в полноразмерном HA эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 355 представляет собой W и аминокислота в положении 432 представляет собой I, или аминокислота в положении 355 представляет собой W, и аминокислота в положении 432 представляет собой I, и аминокислота в положении 380 представляет собой I. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию по типу замены аминокислоты в положении 355 на W и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 432 на I или мутацию по типу замены аминокислоты в положении 355 на W, и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 432 на I, и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 380 на I. Согласно настоящему изобретению было показано, что присутствие данных аминокислот увеличивает уровни тримеров полипептидов по настоящему изобретению.

В определенных других вариантах осуществления аминокислота в положении 355 представляет собой (мутация по типу замены на) W, а аминокислота в положении 378 представляет собой (мутация по типу замены на) T, аминокислота в положении 379 представляет собой (мутация по типу замены на) N, и/или

5 аминокислота в положении 381 представляет собой (мутация по типу замены на) V. Было показано, что присутствие данных аминокислот увеличивает экспрессию и связывание нейтрализующих антител широкого спектра действия.

В определенных вариантах осуществления полипептиды дополнительно содержат введенный мотив гликозилирования (NxT) для N-связанного
10 гликозилирования в положении 401 для защиты потенциальных неоэпитопов в В-петле. Таким образом, согласно настоящему изобретению, полипептиды содержат мотив гликозилирования (NxT) в положениях 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401.

В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены
15 полипептиды стеблевого домена гемагглютинина (HA) вируса гриппа А группы 2, содержащие домены HA1 и HA2, где указанные полипептиды стеблевого домена HA содержат аминокислотную последовательность, которая характеризуется:

(i) делецией головной области в домене HA1, при этом указанная делеция охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты,
20 соответствующей аминокислоте в положении 50, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 302, включительно;

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

(iii) цистеином в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422; или цистеином в аминокислотном положении, соответствующем
30 положению 311, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422; или цистеином в аминокислотном положении, соответствующем положению 308, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 418, при этом указанные цистеиновые остатки образуют (способны образовывать) внутримonomерный дисульфидный мостик; где в аминокислотной

последовательности аминокислота в положении 355 представляет собой W; и где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида стеблевого домена НА соответствует нумерации НЗ в соответствии с номенклатурой НА из Winter et al. (см. выше) на основе нумерации полноразмерного НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

Согласно настоящему изобретению, неожиданно было обнаружено, что полипептиды стеблевого домена НА вируса гриппа группы 2, имеющие аминокислотную последовательность, где аминокислота в положении 355 представляет собой W, характеризовались высокими уровнями экспрессии в клетках млекопитающих, имели повышенную склонность к тримеризации и/или повышенную термостабильность по сравнению с ранее полученными полипептидами стеблевого домена НА группы 2. Кроме того, полипептиды стеблевого домена НА по настоящему изобретению индуцируют гуморальный и/или клеточный иммунный ответ против вируса гриппа группы 2 *in vivo*.

Как известно специалистам в данной области, полноразмерный гемагглютинин (НА0) вируса гриппа, как правило, содержит домен НА1 и домен НА2. Кроме того, полноразмерный гемагглютинин (НА0) вируса гриппа, как правило, содержит стеблевой домен и головной домен. Стеблевой домен образован двумя сегментами домена НА1 и большей частью домена НА2 или им всем. Два сегмента домена НА1 отделены в первичной последовательности глобулярным головным доменом. Как описывается в данном документе, полипептиды стеблевого домена НА по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность, которая содержит несколько модификаций в домене НА1 и/или НА2 по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа полноразмерного полипептида НА (НА0), в частности, аминокислотной последовательностью НА группы 2. В контексте данной заявки нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептидов стеблевого домена НА соответствует нумерации НЗ в соответствии с номенклатурой НА из Winter et al., см. выше (т. е. соответствует нумерации полноразмерного НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1)).

Согласно настоящему изобретению по меньшей мере часть высоковариабельной и иммунодоминантной головной области в домене НА1 полипептида НА вируса гриппа, при этом указанная часть содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность, начинающуюся с аминокислоты в положении 50 и продолжающуюся до аминокислоты в положении 302 включительно, была подвергнута делеции домена НА1 полноразмерного белка НА (НА0) с созданием полипептида

стеблевого домена, также называемого "мини-НА". Остальные части домена НА1 (т. е. N-концевой сегмент домена НА1 и С-концевой сегмент домена НА1) связаны либо напрямую (т. е. без линкера), либо через линкер из 1-10 аминокислот. Таким образом, например, при делеции аминокислотной последовательности от аминокислоты в

5 положении 50 до аминокислоты в положении 302 включительно аминокислота в положении 49 (последняя аминокислота N-концевого сегмента НА1) соединена с аминокислотой в положении 303 (первой аминокислотой С-концевого сегмента НА1) непосредственно либо благодаря замещению подвергнутой делеции головной области линкером из 1-10 аминокислот. Делеция аминокислотной последовательности от

10 аминокислоты в положении 50 до аминокислоты в положении 302 включительно является минимальной делецией в домене НА1. В соответствии с настоящим изобретением, также может быть подвергнута делеции более крупная часть домена НА1, например, аминокислотная последовательность, начинающаяся с аминокислоты в положении 47 и продолжающаяся до аминокислоты в положении 306 включительно, как

15 показано на фигуре 1А в случае более низкой конструкции.

В предпочтительном варианте осуществления делеция в домене НА1 охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно. В таком варианте осуществления полипептид стеблевого домена, таким образом, содержит N-концевой сегмент НА1 до

20 аминокислоты в положении 46 включительно и С-концевой сегмент НА1, начинающийся от аминокислоты в положении 307 (темно-серые части на фиг. 1А).

В предпочтительном варианте осуществления делеция в домене НА1 включает в себе аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно.

25 В некоторых вариантах осуществления подвергнутый делеции участок домена НА1 был замещен линкерной последовательностью из 1-10 аминокислот.

Кроме того, описываемые в настоящем документе полипептиды стеблевого домена НА по настоящему изобретению содержат модификацию тримеризационной области в домене НА2, предпочтительно модификацию в С-спирали, для улучшения

30 тримеризации полипептидов стеблевого домена НА после делеции головной области. В определенных предпочтительных вариантах осуществления указанная модификация в домене НА2 представляет собой модификацию, которая усиливает тримеризацию полипептида стеблевого домена НА.

В определенных вариантах осуществления указанная модификация включает введение гетерологичного тримеризационного домена в С-спираль. Обычно считается, что С-спираль содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты в

положении 405 до аминокислоты в положении 434 включительно (нумерация НЗ). В предпочтительном варианте осуществления указанный гетерологичный тримеризационный домен был введен в положение, соответствующее аминокислотной последовательности от аминокислоты в положении 405 до аминокислоты в положении 419 включительно (фиг. 1А). Таким образом, в определенных вариантах осуществления исходная (wt) аминокислотная последовательность в домене НА2 от положения 405 до положения 419 была замещена гетерологичной тримеризационной последовательностью той же длины, т. е. с идентичным числом аминокислот.

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

В определенных предпочтительных вариантах осуществления модифицированная тримеризационная область (т. е. содержащая гетерологичный тримеризационный домен) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из $_{405}\text{RMKQIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 9) и $_{405}\text{PMKQIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из аминокислот гетерологичной тримеризационной последовательности была подвергнута мутации по типу замены на С, что обеспечивает образование межмономерного цистеинового мостика (как описано ниже). Таким образом, в определенных вариантах осуществления тримеризационная область содержит, таким образом, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

$_{405}\text{RMKCIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 11) и $_{405}\text{PMKCIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 12). В предпочтительном варианте осуществления тримеризационная область состоит из аминокислотной последовательности $_{405}\text{PMKCIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 12).

В определенных вариантах осуществления модификация включает изменение, предпочтительно оптимизацию последовательности гептадного повтора в С-спирали, предпочтительно в тримеризационной области, содержащей аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 405 до аминокислоты в положении 419 включительно. Гептадный повтор, обозначаемый [abcdefg]_n, как правило, имеет гидрофобные остатки в **a** и **d** и полярные/заряженные остатки в **e** и **g**. Эти мотивы

являются основой для большинства суперспиральных структур, которые представляют собой структурный мотив в белках, в котором альфа-спирали скручены друг с другом подобно нитям в канате (димеры и тримеры являются наиболее распространенными типами) (Ciani et al., 2010).

5 В качестве дополнительной модификации полипептиды стеблевого домена НА в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере два цистеиновых остатка, образующих (способных образовывать) внутримonomерный (или внутривитомерный) цистеиновый (или дисульфидный) мостик. Сконструированный цистеиновый мостик может быть введен посредством мутации по меньшей мере одного

10 остатка (если другой уже является цистеином), но обычно посредством мутации двух остатков, которые являются пространственно близкими друг к другу, по типу замены на цистеин, в результате чего самопроизвольно или посредством активного окисления образуется ковалентная связь между атомами серы в этих остатках. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат цистеин в положении 310 и цистеин в

15 положении 422, или цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 311, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422, или цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 308, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем

20 положению 418, что делает возможным образование внутримonomерного цистеинового мостика. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию по типу замены аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 310 и/или 422, на С, или мутацию по типу замены аминокислоты в положениях 311 и/или 422 на С, или мутацию по типу замены аминокислоты в аминокислотном положении, соответствующем

25 положению 308 и/или 418 на С, при этом указанные цистеиновые остатки образуют указанный внутримonomерный цистеиновый мостик. Такие цистеиновые остатки, таким образом, образуют внутримonomерный (или внутривитомерный) цистеиновый (или дисульфидный) мостик, который стабилизирует белок. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат (мутацию по типу замены на) цистеин в положении 310 и (мутацию по типу замены на) цистеин в положении 422 с образованием

30 по меньшей мере одного внутримonomерного цистеинового мостика.

Полипептиды согласно настоящему изобретению обычно содержат по меньшей мере 4 нативных (т. е. встречающихся в природе) мотива гликозилирования (или гликановых мотивов) (N_xT) для N-связанного гликозилирования, например, гликановый мотив в положениях 8-10 (₈NST₁₀), положениях 22-24 (₂₂NGT₂₄), положениях 38-40

(₃₈NAT₄₀) и 483-485 (₄₈₃NGT₄₈₅). В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере один введенный гликановый мотив в положениях 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401, как описано выше. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере один дополнительный введенный мотив гликозилирования. Таким образом, в определенных вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный мотив N-связанного гликозилирования присутствует и/или введен в положениях 392-394 для N-связанного гликозилирования в положении 392 и/или в положениях 393-395 для N-связанного гликозилирования в положении 393. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат мотив гликозилирования в положениях 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401 и мотив гликозилирования в положениях 393-395 для N-связанного гликозилирования в положении 393.

В дополнительных вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 388, представляет собой М. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении, соответствующем положению 388, подвергнута мутации по типу замены на М. Однако в данном положении также возможны и другие аминокислоты, в том числе без ограничения Т, V, I, L, F, Y, W, H, K и R.

Более того, в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность, где:

- аминокислота в положении 31 представляет собой Е, а аминокислота в положении 34 представляет собой V;
- аминокислота в положении 392 представляет собой S или Р;
- аминокислота в положении 395 представляет собой Т или Р;
- аминокислота в положении 399 представляет собой S или Р;
- аминокислота в положении 435 представляет собой N или R; и/или
- аминокислота в положении 439 представляет собой Y.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 31 представляет собой Е, а аминокислота в положении 34 представляет собой V. В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат аминокислотную последовательность, содержащую мутацию по типу замены аминокислоты в положении 31 на Е и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 34 на V. Согласно настоящему изобретению, было обнаружено, что вследствие присутствия таких аминокислотных остатков (т. е. 31Е и 34V) происходит оптимизация сети водородных

связей, которая является важным фактором стабильности полипептидов по настоящему изобретению. Полипептиды могут дополнительно содержать аминокислотную последовательность, где аминокислота в положении 392 представляет собой (мутация по типу замены на) S или P; аминокислота в положении 395 представляет собой (мутация по типу замены на) T или P; и/или аминокислота в положении 399 представляет собой (мутация по типу замены на) S или P. Таким образом, полипептиды по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько мутаций в так называемой В-петле, причем В-петля содержит аминокислотную последовательность, начиная от аминокислоты в положении 385 до аминокислоты в положении 404 включительно (см. фиг. 1С). Мутации В-петли увеличивают растворимость полипептидов за счет снижения гидрофобности. В определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептиды по сравнению с полипептидом НА дикого типа содержат, таким образом, по меньшей мере одну дополнительную мутацию в В-петле, выбранную из группы, состоящей из:

- мутации по типу замены аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 392, на S или P, предпочтительно на S;
- мутации по типу замены аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 395, на T или P; предпочтительно на T; и
- мутации по типу замены аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 399, на S или P, предпочтительно на P.

Полипептиды могут дополнительно содержать мутацию по типу замены аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 435, на N или R, предпочтительно на N; и/или мутацию по типу замены аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 439, на Y. Считается, что такие мутации оптимизируют поверхность раздела тримеров, способствуя стабильности тримеров в растворе.

Следует еще раз отметить, что используемая в данном документе нумерация аминокислотных положений основана на нумерации НЗ согласно Winter et al. (1981). Также следует еще раз отметить, что нумерация аминокислотных положений, используемая в данном документе, основана на нумерации положений в полноразмерном полипептиде НА НЗ (НА0). Таким образом, используемый в данном документе термин "аминокислота в положении 434" относится к аминокислоте в положении 434 в НА0 НЗ. Нумерация, таким образом, не относится к фактическим положениям аминокислот в полипептидах стеблевого домена НА по настоящему изобретению вследствие делеции головного домена (см. фигуру 15).

В соответствии с настоящим изобретением полипептид стеблевого домена НА представляет собой полипептид НА группы 2. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением, модификации, описываемые в данном документе, были введены в НА вируса гриппа из филогенетической группы 2, такого как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3, Н7 или Н10, с получением в результате полипептидов стеблевого домена НА по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления полипептид стеблевого домена НА представляет собой полипептид НА Н3. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептид стеблевого домена НА получен из НА вируса гриппа А, содержащего НА подтипа Н3, как, например, из вируса гриппа A/Hong Kong/1/68 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, или A/Wisconsin/67/2005 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, или A/Singapore/INFMH/16/0019/2016 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14. Специалисту в данной области техники будет понятно, что полипептиды по настоящему изобретению также могут быть получены из НА других штаммов вируса гриппа А Н3, в том числе без ограничения A/Perth/16/2009 (SEQ ID NO: 15), A/Brisbane/10/2007 (SEQ ID NO: 16) или A/Panama/2007/1999 (SEQ ID NO: 17).

Как описано выше, полипептиды стеблевого домена могут содержать или могут не содержать линкерную последовательность из 1-10 аминокислотных остатков, замещающую подвергнутую делеции последовательность головного домена НА1 и тем самым соединяющую две оставшиеся части НА1. В определенных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит 2, 3 или 4 аминокислоты. Линкерная последовательность может являться гетерологичной линкерной последовательностью, т. е. аминокислотной последовательностью, которая не встречается в НА, встречающемся в природе или дикого типа, такой как без ограничения GGGG и GPSG.

В определенных вариантах осуществления линкерная последовательность представляет собой гомологичную линкерную последовательность, т. е. аминокислотную последовательность, полученную из подвергнутой делеции соответствующей головной области, такую как без ограничения NPHR, GDPH, NGGS, GGSN, GSNA, GPGS, GSGF, GSG, GG, GGS, SGS, HPST, IPNI, GLSS, KPGD, DAPI, TPN и TPNG.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды не содержат линкерную последовательность.

Как описано выше, расщепление белка HA0 вируса гриппа (на HA1 и HA2) требуется для его активности, что облегчает проникновение вирусного генома в клетки-мишени, вызывая слияние эндосомальной мембраны хозяина с вирусной мембраной.

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

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

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность (иногда называемая сигнальным пептидом, нацеливающим сигналом, сигналом локализации, последовательностью локализации, транзитным пептидом, лидерной последовательностью или лидерным пептидом) представляет собой короткий пептид (обычно длиной 16-30 аминокислот), который присутствует на N-конце большинства новосинтезированных белков, которые задают направление движения в сторону секреторного пути. Сигнальные последовательности функционируют, вызывая в клетке

перемещение белка, обычно к клеточной мембране. Во многих случаях аминокислоты, составляющие сигнальный пептид, отщепляются от белка после достижения им его конечного места назначения. В НА вируса гриппа сигнальные последовательности обычно содержат первые 16 аминокислот аминокислотной последовательности

5 полноразмерного НА0 (соответствующие аминокислотам от положения -6 до положения 10 согласно нумерации НЗ, см. фигуру 15).

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат сигнальную последовательность (часть сигнальной последовательности). Полипептиды могут содержать сигнальную последовательность дикого типа (часть сигнальной

10 последовательности дикого типа) или могут содержать альтернативные сигнальные последовательности (часть альтернативных сигнальных последовательностей), такие как, без ограничения, сигнальная последовательность, выбранная из группы:

МКТПІАІSYІFCLALG (SEQ ID NO: 18);
 МКТПІАІSYІLCLVFA (SEQ ID NO: 19);
 15 МКТПІАІSYІLCLVFT (SEQ ID NO: 20); и
 МКТІVАІSYІLCLVFA (SEQ ID NO: 21).

В предпочтительных вариантах осуществления (растворимые) полипептиды не содержат сигнальную последовательность.

В предпочтительном варианте осуществления полипептиды по настоящему

20 изобретению характеризуются

- (i) делецией головной области из домена НА1, при этом указанная делеция охватывает аминокислотную последовательности от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно, где аминокислота в положении 46 непосредственно связана с аминокислотой в
- 25 положении 307;
- (ii) введением гетерологичного тримеризационного домена, содержащего аминокислотную последовательность ⁴⁰⁵PMKCIEDKIEEIESK₄₁₉ (SEQ ID NO: 12), заменяющую исходную аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 405 до аминокислоты в положении 419 включительно;
- 30 (iii)(мутацией по типу замены на цистеин) цистеином в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с (мутацией по типу замены на цистеин) цистеином в положении, соответствующем положению 422;
- (iv) введенными мотивами гликозилирования в положениях: 393-395 (т. е. ³⁹³NQT₃₉₅) и 401-403 (т. е. ⁴⁰¹NAT₄₀₃);

и где, более того, в аминокислотной последовательности:

- (a) аминокислота в положении 355 представляет собой (мутация по типу замены на) W;
- (b) аминокислота в положении 432 представляет собой (мутация по типу замены на) I,
5 а аминокислота в положении 380 представляет собой (мутация по типу замены на) I;
- (c) аминокислота в положении 378 представляет собой (мутация по типу замены на) T, а аминокислота в положении 379 представляет собой (мутация по типу замены на) N, и/или аминокислота в положении 381 представляет собой (мутация по типу замены на) V;
10
- (d) аминокислота в положении 388 представляет собой (мутация по типу замены на) M;
- (e) аминокислота в положении 31 представляет собой (мутация по типу замены на) E,
15 а аминокислота в положении 34 представляет собой (мутация по типу замены на) V;
- (f) аминокислота в положении 392 представляет собой (мутация по типу замены на) S;
- (g) аминокислота в положении 395 представляет собой (мутация по типу замены на) T;
- (h) аминокислота в положении 398 представляет собой (мутация по типу замены на) C;
20
- (i) аминокислота в положении 399 представляет собой (мутация по типу замены на) P;
- (j) аминокислота в положении 408 представляет собой (мутация по типу замены на) C;
25
- (k) аминокислота в положении 435 представляет собой (мутация по типу замены на) N;
- (l) аминокислота в положении 439 представляет собой (мутация по типу замены на) Y и
- (m) аминокислота в положении 329 представляет собой (мутация по типу замены на) Q;
30

где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной последовательности полипептида стеблевого домена НА соответствует нумерации H3,

соответствующей нумерации в полноразмерном НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

В конкретном варианте осуществления домены HA1 и HA2 получены из вируса гриппа, содержащего НА подтипа H3, предпочтительно из вируса гриппа A/Hong Kong/1/68.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из вируса гриппа, содержащего НА подтипа H3, предпочтительно вируса гриппа A/Hong Kong/1/68, где одна или несколько аминокислот в указанных доменах HA1 и HA2 H3 были подвергнуты мутации по типу замены на соответствующие аминокислоты НА H7.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления домены HA1 и HA2 получены из вируса гриппа, содержащего НА подтипа H3, предпочтительно из вируса гриппа A/Hong Kong/1/68 по пункту 19 формулы изобретения, где:

- (a) аминокислота в положении 25 представляет собой (мутация по типу замены на) K;
- (b) аминокислота в положении 367 представляет собой (мутация по типу замены на) Y;
- (c) аминокислота в положении 378 представляет собой (мутация по типу замены на) T;
- (d) аминокислота в положении 475 представляет собой (мутация по типу замены на) D;
- (e) аминокислота в положении 476 представляет собой (мутация по типу замены на) D; и/или
- (f) аминокислота в положении 479 представляет собой (мутация по типу замены на) A.

Без желания привязываться к какой-либо теории считается, что путем восстановления поверхности полученного из H3 стабилизированного полипептида стеблевого домена с требуемыми характеристиками, такими как экспрессия, сворачивание и термостабильность, в направлении НА H7 можно индуцировать ответ с выработкой антител, который может придавать большую защиту от далеких вирусов H7, без необходимости полностью переключаться на полученный из H7 полипептид стеблевого домена с менее благоприятными характеристиками, т. е. который труднее производить, который имеет более низкие уровни экспрессии и более низкую стабильность.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат домен HA2, содержащий трансмембранный (TM) и цитоплазматический (CD) домены (при этом указанные TM и CD домены содержат аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности, начинающейся с

5 аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 514, и продолжающейся до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 550 включительно (нумерация H3)). Таким образом получают мембраносвязанные полипептиды мини-HA.

Для получения секретируемых растворимых полипептидов стеблевого домена в определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат трансмембранный и

10 цитоплазматический домены. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат усеченный домен HA2, в частности, домен HA2, который является усеченным на С-конце. Усеченный домен HA2 в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, является более коротким, чем последовательность полноразмерного HA2, благодаря делеции одного или нескольких

15 аминокислотных остатков на С-конце домена HA2.

В определенных вариантах осуществления была подвергнута делеции С-концевая часть домена HA2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 514, таким образом был удален практически полный трансмембранный и цитоплазматический домен.

20 В определенных вариантах осуществления также была подвергнута делеции часть С-концевой спирали. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что даже при делеции большей части домена HA2 могут быть получены стабильные растворимые полипептиды стеблевого домена HA. Таким образом, в определенных вариантах осуществления С-концевая часть домена HA2, начинающаяся

25 с аминокислотного положения 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513 или 514, была подвергнута делеции (в этом случае также нумерация согласно нумерации H3, описанной у Winter et al., см. выше) с получением растворимого полипептида после экспрессии в клетках.

В предпочтительном варианте осуществления делеции была подвергнута С-концевая часть домена HA2, начинающаяся от положения, соответствующего 506.

Гетерологичная аминокислотная последовательность (т. е. аминокислотная последовательность, которая не встречается в природе в HA вируса гриппа) необязательно может быть соединена с (усеченным) доменом HA2.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления последовательности His-метки, например, НННННН (SEQ ID NO: 22) или НННННННН (SEQ ID NO: 23), или FLAG-метка DYKDDDDK (SEQ ID NO: 24), или С-метка EPEA (SEQ ID NO: 25), или их комбинация были соединены с С-концевой аминокислотой (необязательно усеченного) домена HA2 для целей выявления и/или очистки. В определенных вариантах осуществления гетерологичная аминокислотная последовательность, такая как последовательность His-метки, может быть присоединена к (усеченному) домену HA2 с помощью линкера. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать участок протеолитического расщепления (часть участка протеолитического расщепления), например, аминокислотную последовательность IEGR (SEQ ID NO: 26) или LVPRGS (SEQ ID NO: 27), для ферментативного удаления последовательности His-метки после очистки.

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

GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 28),

AAADYKDDDDKLVPGRSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHH (SEQ ID NO: 29.),

AAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH (FLAG - линкер GS - His-метка), (SEQ ID NO: 30),

EGRAAAGGSGGGGSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVT PIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVI DGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGV TGWRLCERILAAAASHPQFEKGAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEK (NanoLuc - Strep-метка), (SEQ ID NO: 31),

EGRAAAGGSGGGGSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVT PIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVI DGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGV TGWRLCERILAGAAEPEA (NanoLuc - С-метка), (SEQ ID NO: 32),

EGRAAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEK (Strep-метка), SEQ ID NO: 33),

5 EGRAAALPETGGGAAEPEA (Сортаза - С-метка), (SEQ ID NO: 34),

SGRDYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGWSHPQFEK
GAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEK (FLAG - линкер GS - Strep-метка), (SEQ ID NO: 35),
и

10

EGRAAAEQKLISEEDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGWSHP
QFEKGAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEK (Мус-метка - линкер GS - Strep-метка), (SEQ
ID NO: 36).

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды стеблевого домена HA по
настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность, выбранную из
20 SEQ ID NO: 40-44, 46-64, 66, 67, 69-97, 156-164, 169-181 и 189-212.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид содержит
аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 40-42, 207 и 210-212,
предпочтительно аминокислотную последовательность, выбранную из 210-212, более
предпочтительно SEQ ID NO: 210.

25 В определенных вариантах осуществления полипептиды гликозилируются при
экспрессии в подходящих клетках (например, клетках млекопитающих). Полипептиды
по настоящему изобретению обычно содержат 4 нативных мотива гликозилирования
(NxT), как описано выше. Как также описано выше, согласно настоящему изобретению,
в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере
30 один введенный мотив гликозилирования в положениях 401-403 для N-связанного
гликозилирования в положении 401. Полипептиды предпочтительно содержат
дополнительный введенный мотив гликозилирования в положениях 393-395 для N-
связанного гликозилирования в положении 393.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены мультимерные, предпочтительно тримерные, полипептиды стеблевого домена НА. Для получения стабильных тримерных полипептидов стеблевого домена НА полипептиды по настоящему изобретению предпочтительно содержат по меньшей мере два цистеиновых остатка, образующих (способных образовывать) межмономерный (также называемый межпротомерным) цистеиновый мостик. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды содержат цистеин в положении, соответствующем положению 396, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408, или цистеин в положении, соответствующем положению 397, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408, или цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408, или цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 405.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат мутацию по типу замены аминокислоты в положении 396 на С и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 408 на С; или мутацию по типу замены аминокислоты в положении 397 на С и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 408 на С; или мутацию по типу замены аминокислоты в положении 398 на С и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 408 на С, или мутацию по типу замены аминокислоты в положении 398 на С и мутацию по типу замены аминокислоты в положении 405 на С; в результате чего образуется межмономерный цистеиновый мостик между цистеином в положении 396 первого мономера и цистеином в положении 408 второго мономера; или между цистеином в положении 397 первого мономера и цистеином в положении 408 второго мономера; или между цистеином в положении 398 первого мономера и цистеином в положении 408 второго мономера; или между цистеином в положении 398 первого мономера и цистеином в положении 405 второго мономера. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления аминокислоты в положениях 405 или 408 находятся в гетерологичной тримеризационной последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления полипептиды содержат цистеин в положении 398 и цистеин в положении 408, в результате чего образуется межмономерный цистеиновый мостик между цистеином в положении 398 первого мономера и аминокислотой в положении 408 второго мономера.

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

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

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209.

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

Кроме того, настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, является частью вектора, например, плазмиды. С такими векторами можно легко производить

манипуляции с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и их, например, конструируют так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Используемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и

5 который можно использовать для обеспечения транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. При использовании клеток-хозяев предпочтительно, чтобы вектор представлял собой интегрирующий вектор. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой эписомально реплицирующийся вектор. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить

10 последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функциональным образом. Специалистам в данной области хорошо известно, что для достижения экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, последовательности, способные управлять экспрессией, можно функционально связать с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими

15 полипептид, с получением рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок или полипептид в экспрессируемом формате. Последовательности, управляющие экспрессией, могут включать в себя промоторы, энхансеры и т. п., а также их комбинации. Они должны быть способными функционировать в клетке-хозяине, тем самым управляя экспрессией последовательностей нуклеиновой кислоты,

20 которые функционально связаны с ними. Специалист в данной области осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получить из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или разработать искусственным путем. Экспрессия

25 нуклеиновых кислот, представляющих интерес, может происходить под управлением природного промотора или его производного или под управлением полностью гетерологичного промотора (Kaufman, 2000). Некоторые хорошо известные и наиболее часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например, промотор

30 E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как немедленно-ранний (IE) промотор CMV (называемый в данном документе промотором CMV) (получаемый, например, из pcDNA, Invitrogen), промоторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40) (Das et al, 1985), и т. п. Из эукариотических клеток также можно получить подходящие промоторы, такие как промоторы генов металлотioneинов (MT),

промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1 α) (Gill et al., 2001), промотор гена убиквитина С или UB6 (Gill et al., 2001), промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов белков теплового шока и т. п. Тестирование промоторной функции и силы промотора является стандартной практикой для

5 специалиста в данной области и, как правило, может, например, охватывать клонирование тестируемого гена, такого как ген lacZ, люциферазы, GFP и т. д., позади промоторной последовательности и тестирование экспрессии тестируемого гена. Разумеется, промоторы можно изменять посредством делеции, добавления, мутации последовательностей в них и тестировать в отношении функциональности для

10 обнаружения новых, ослабленных или улучшенных, промоторных последовательностей. В соответствии с настоящим изобретением сильные промоторы, которые обеспечивают высокие уровни транскрипции в выбранных эукариотических клетках, являются предпочтительными.

Конструкции можно вводить путем трансфекции в эукариотические клетки

15 (например, клетки растений, грибов, дрожжей или животных) или подходящие прокариотические системы экспрессии, такие как *E. coli*, с помощью способов, которые хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых случаях подходящую последовательность "метки" (такой как, например, без ограничения, His-, Мус-, Strep-метка, сортаза или FLAG-метка) или полного белка (такого как, например, без

20 ограничения, мальтозосвязывающий белок или глутатион-S-трансфераза) можно добавлять к последовательностям по настоящему изобретению, описанным выше, для обеспечения очистки и/или идентификации полипептидов из клеток или надосадочной жидкости. Необязательно можно включить последовательность, содержащую специфический участок протеолиза, для последующего удаления метки путем

25 протеолитического расщепления.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды вырабатываются в клетках млекопитающих.

Очищенные полипептиды можно анализировать с помощью спектроскопических способов, известных из уровня техники (например, спектроскопии

30 кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и ЯМР-спектроскопии или рентгеновской кристаллографии), для исследования наличия необходимых структур, таких как спирали и бета-складчатые слои. ELISA, AlphaLISA, биослойную интерферометрию без метки (Octet) и FACS и т. п. можно применять для исследования связывания полипептидов по настоящему изобретению с

нейтрализующими антителами широкого спектра действия, такими как CR8020 и/или CR9114. Таким образом, можно выбрать полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, имеющие нужную конформацию. Содержание тримеров можно анализировать, например, с применением электрофореза в геле с SDS в

5 невосстанавливающих условиях, эксклюзионной хроматографии в присутствии Fab-фрагментов антител из нейтрализующих антител широкого спектра действия, таких как CR8020 и/или CR9114, а также AlphaLISA с применением различным образом меченных антител. Стабильность полипептидов можно оценить, как описано выше, после температурного стресса, циклов замораживания-размораживания, повышения
10 концентрации белка или взбалтывания. Температуру плавления полипептида можно дополнительно оценить с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) и/или дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

В определенных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту вставляют в рекомбинантный вектор, который можно применять в качестве компонента вакцины.
15 Предпочтительно, рекомбинантный вектор представляет собой аденовирус человека, например, аденовирус человека серотипа 26 (Ad26). Таким образом, в настоящем изобретении также представлены рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид стеблевого домена НА в соответствии с настоящим изобретением. В предпочтительном варианте
20 осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид стеблевого домена, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209.

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

вариантах осуществления в векторе имеет место дефицит по меньшей мере одного существенно важного функционального гена области E1 и по меньшей мере части области E3, не являющейся существенно важной. В аденовирусном векторе может иметь место "множественный дефицит", что означает, что в данном аденовирусном векторе имеет место дефицит одного или нескольких существенно важных функциональных генов в каждой из двух или более областей аденовирусного генома. Например, в вышеупомянутых аденовирусных векторах с дефицитом E1 или с дефицитом E1 и E3 может дополнительно иметь место дефицит по меньшей мере одного существенно важного гена области E4 и/или по меньшей мере одного существенно важного гена области E2 (например, области E2A и/или области E2B). Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913.

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

Кроме того, в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением, а также фармацевтически приемлемый носитель. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество полипептидов, нуклеиновых кислот и/или векторов по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции, кроме того, содержат фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель в используемых дозах и концентрациях не будет вызывать нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым его вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy - 22nd edition, Loyd V. Ed. Allen, Pharmaceutical Press [2013]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds, Taylor & Francis [2000]; Remington: Essentials of Pharmaceutics, Linda Felton, Pharmaceutical Press [2013] и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Термин "носитель" относится к разбавителю, наполнителю или среде, с которыми вводят полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или векторы. Солевые растворы и водные

растворы декстрозы и глицерина можно, например, использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов.

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

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

В частности, настоящее изобретение относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описываемым в данном документе, для применения в индуцировании иммунного ответа против вируса гриппа, предпочтительно вируса гриппа группы 2.

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

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индуцирования иммунного ответа против вируса гриппа А группы 2. Иммунный ответ может включать в себя гуморальный (т. е. индукцию выработки антител, нейтрализующих вирус гриппа) и/или клеточный иммунный ответ.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индуцирования иммунного ответа против по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти или шести подтипов вирусов гриппа группы 2. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индуцирования иммунного ответа против вируса гриппа, содержащего НА подтипа Н3.

В определенных вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ является эффективным для предупреждения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой вирусом гриппа А группы 2, таким как вирус гриппа А, содержащий НА подтипа Н3, и/или вирус гриппа А, содержащий НА подтипа Н7. В определенных вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ является эффективным для предупреждения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, содержащим НА подтипа Н3. В определенных вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ является эффективным для предупреждения гриппозной вирусной инфекции, вызываемой вирусом гриппа А, содержащим НА подтипа Н3 и Н7.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или векторам, описанным в данном документе, для применения в качестве вакцины против гриппа, в частности, для применения в качестве вакцины против гриппа, вызываемого штаммом вируса гриппа группы 2.

В определенных вариантах осуществления полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы по настоящему изобретению вводят в комбинации с адъювантом. Адъювант можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения полипептидов, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции в виде масляной эмульсии (или композиции типа "масло в воде"), в том числе эмульсии сквалена в воде, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы на основе сапонины, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорилипид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), необязательно составленный в форме липосомы, олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилированные бактериальные токсины или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT E. coli, холерный токсин СТ, коклюшный токсин РТ или столбнячный анатоксин ТТ, Matrix М или их комбинации. В дополнение, можно применять известные иммуностимулирующие технологии, такие как слияние полипептидов по настоящему изобретению с белками, известными из уровня техники как усиливающие иммунный ответ (например, со столбнячным анатоксином, CRM197,

гСТВ, бактериальными флагеллинами или другими), или включение полипептидов в виросомы, или их комбинации.

Введение полипептидов, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов согласно настоящему изобретению можно выполнять с помощью стандартных путей введения.

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

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

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

Кроме того, в настоящем изобретении дополнительно представлены способы предупреждения заболевания, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного
30 количества полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описанных в данном документе. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, нуклеиновой кислоты и/или вектора, которое является эффективным для предупреждения, облегчения и/или лечения заболевания или состояния, обусловленного инфицированием вирусом гриппа. Предупреждение охватывает ингибирование или

снижение распространения вируса гриппа или ингибирование или ослабление начала проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфицированием вирусом гриппа. Выражение "облегчение", используемое в данном документе, может относиться к ослаблению видимых или

5 ощутимых симптомов заболевания, виремии или любых других поддающихся измерению проявлений инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Субъект, нуждающийся в лечении, включает субъектов, у которых уже имеется состояние, обусловленное инфицированием вирусом гриппа, а также тех, у которых необходимо предупредить инфицирование вирусом гриппа. Полипептиды, нуклеиновые

10 кислоты и/или векторы по настоящему изобретению, таким образом, можно вводить субъекту, ранее не получавшему лечение, т. е. субъекту, у которого отсутствует заболевание, вызванное гриппозной вирусной инфекцией, или который не был инфицирован и в настоящее время не инфицирован гриппозной вирусной инфекцией, или субъектам, которые уже были инфицированы вирусом гриппа.

В одном варианте осуществления предупреждение и/или лечение может быть нацелено на группы пациентов, которые являются восприимчивыми к гриппозной вирусной инфекции. Такие группы пациентов включают без ограничения, например, пожилых (например, в возрасте ≥ 50 лет, в возрасте ≥ 60 лет и предпочтительно в возрасте ≥ 65 лет), молодых (например, в возрасте ≤ 5 лет, в возрасте ≤ 1 года),

20 госпитализированных пациентов, субъектов с ослабленным иммунитетом и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но у которых наблюдался неудовлетворительный противовирусный ответ.

Полипептиды, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы по настоящему изобретению можно вводить субъекту в комбинации с одним или несколькими другими

25 активными средствами, такими как альтернативные вакцины против гриппа, моноклональные антитела, противовирусные средства, антибактериальные средства и/или иммуномодулирующие средства. Одно или несколько других активных средств могут быть полезными в лечении и/или предупреждении заболевания, вызываемого вирусом гриппа, или могут облегчать симптом или состояние, ассоциированное с

30 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.

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

5 ПРИМЕРЫ

Пример 1. *Полипептиды на основе стеблевого домена НА - строение и структурные элементы предпочтительных полипептидов по настоящему изобретению: UFV180088, UFV 180089 и UFV180090*

10

Полипептид UFV180088, представляющий собой стеблевой домен (или стволовой домен) нерасщепленного гемагглютинаина вируса гриппа (НА₀) из вируса гриппа H3 A/Hong Kong/1/68, получали путем делеции (по меньшей мере части) головного домена из НА₁, в частности, области, содержащей аминокислоты, начиная с

15 положения 47 и до аминокислоты в положении 306 включительно (фигуры 1A и 1B). Следует отметить, что для нумерации аминокислотных положений в настоящем изобретении используется нумерация H3 по Winter et al., см. выше. Основные структурные элементы полипептида по настоящему изобретению (мини-НА), в том числе А-спираль, В-петля и С-, D- и Е-спирали, указаны на фигуре 1С.

20

При экспрессии в виде растворимого эктодомена полипептиды по настоящему изобретению усечены на С-конце после последней спирали (которая заканчивается в положении 499). UFV180088 был усечен в положении 506, т. е. была подвергнута делеции С-концевая часть последовательности НА, начинающаяся с аминокислоты в

положении 506.

25

Полипептид по настоящему изобретению, UFV 180088, описанный в данном примере, делали устойчивым к расщеплению протеазами путем мутации по типу замены аминокислоты аргинин (R), которая является природным одноосновным участком расщепления, в положении 329 (т. е. С-концевой аминокислоты из домена НА₁, см. фигуру 1), например, на глутамин (Q). В отличие от нативного

30 полноразмерного НА, полипептиды по настоящему изобретению, содержащие мутацию R329Q, больше не могут расщепляться и не могут подвергаться соответствующему конформационному изменению, при котором гидрофобный слитый пептид погружается во внутреннюю часть белка.

Удаление головного домена оставляет открытой часть молекулы НА, которая ранее была защищена от водного растворителя. По этой причине несколько аминокислотных остатков в В-петле, т. е. в области, содержащей аминокислоты 385-404 (фигура 1С), подвергали мутации относительно родительского полноразмерного НА дикого типа из A/Hong Kong/1/1968 для стабилизации полипептида стеблевого домена. В частности, аминокислоту в положении 388 подвергали мутации по типу замены на М, и аминокислоту в положении 392 подвергали мутации по типу замены на S.

Далее, для уменьшения склонности к спирализации у В-петли вводили пролин, в частности, пролин в положении 399. Наконец, для защиты потенциальных неозепитопов в В-петле в В-петлю вводили один или два мотива для N-связанного гликозилирования (например, NxT), в частности мотив гликозилирования в положениях 393-395 для N-связанного гликозилирования в положении 393 и мотив гликозилирования в положениях 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401.

Более того, для облегчения стабильной тримеризации растворимого полипептида, полученного из стеблевого домена НА, в домен НА₂, в частности в С-спираль, вводили последовательность тримеризационного домена, полученную из GCN4, ₄₀₅PMKCIEDKIEEIESK₄₁₉ (SEQ ID NO: 12), замещая исходную аминокислотную последовательность (т. е. дикого типа) от аминокислоты в положении 405 до аминокислоты в положении 419 включительно.

Кроме того, цистеиновые остатки (если их еще не было) вводили в положения 398 и 408 (следует отметить, что положение 408 находится во вводимой последовательности GCN4) с образованием межпротомерных дисульфидных мостиков между цистеином в положении 398 первого мономера и цистеином в положении 408 смежного мономера для ковалентного связывания мономеров в тримерный полипептид стеблевого домена.

Для дополнительной стабилизации и увеличения экспрессии полипептида UFV180088, а также для обеспечения правильного сворачивания, подобного стеблевому домену полноразмерного НА дикого типа, в полипептид вводили дополнительные мутации по типу замены, в частности, в положения 31 (D31E), 34 (I34V), 310 (K310C), 355 (H355W), 378 (N378T), 379 (379N), 380 (K380I), 381 (L381V), 422 (S422C), 432 (E432I), 435 (H435R) и 439 (L439Y) (фигура 1D).

Получали варианты полипептида UFV180088, т. е. UFV 180089 и UFV180090. Данные полипептиды содержали дополнительные мутации по сравнению с UFV180088.

Таким образом, UFV180089 содержал дополнительные мутации (по сравнению с UFV180088) L367Y, N475D, A476D и E479A. UFV180090 содержал дополнительные (по сравнению с UFV 180088) мутации L25K, L367Y, A476D и E479A и не содержал мутации G379N и L381V.

5

Пример 2. *Экспрессия, очистка и определение характеристик в условиях in vitro тримерных полипептидов по настоящему изобретению*

Экспрессия белка в клетках млекопитающих

10 Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению UFV180088, UFV180089 и UFV180090 (которые описаны в примере 1), синтезировали (GenScript) и клонировали в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная в собственной лаборатории плаزمида pcDNA3 с усиленным промотором CMV). Полипептиды получали в суспензии клеток ExpiCHO, культивируемых в среде для
15 экспрессии ExpiCHOTM, посредством временной трансфекции с помощью соответствующей ДНК промышленного типа с применением реагента для трансфекции ExpiFectamineTM (Gibco, ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. К культурам клеток через 1 день после трансфекции добавляли стимулятор ExpiFectamine CHO и подпитку ExpiCHO (Gibco, ThermoFisher Scientific) в
20 соответствии с протоколом производителя. Образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие секретируемые полипептиды, собирали в дни 7-11 и осветляли путем центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтр-насадку на бутылку с размером пор 0,2 мкм (Corning).

Очистка белков

Полипептиды очищали посредством двухстадийного протокола. Вначале собранную и осветленную надосадочную жидкость культуры загружали в колонку HiScale 16/20 (GE Healthcare), упакованную аффинной смолой (Capture Select), которая состоит из однодоменного антитела, специфичного к НА, иммобилизованного на
30 агарозных гранулах (ThermoFisher Scientific). Данная смола высокоспецифична к С-метке, кислотному пептиду из четырех остатков (E-P-E-A (SEQ ID NO: 25), который был слит с С-концом полипептидов. Количество вносимого полипептида в собранной надосадочной жидкости культуры определяли с помощью ОСТЕТ перед очисткой (см. абзац; *Анализ надосадочной жидкости культуры и очищенного белка*). Элюирование

белков с С-меткой проводили с применением TRIS-буфера, содержащего 2 М $MgCl_2$. На основании УФ-сигнала (A280) элюированные фракции объединяли и фильтровали через фильтровальную мембрану Millex-GV с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore). Затем собранный пик элюирования вносили в колонку Superdex 200 pg 26/60 (GE Healthcare), уравновешенную подвижным буфером (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8), для удаления потенциальных мультимерных и/или мономерных белковых примесей. Фракции тримеров объединяли и оценивали чистоту с помощью аналитического SEC-MALS.

10 Анализ надосадочной жидкости культуры и очищенного белка

Как описано выше, уровень экспрессированного полипептида стеблевого домена в собранной надосадочной жидкости культуры оценивали перед очисткой с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы OCTET (FortéBio). Вкратце: конъюгат биотина и антитела к С-метке CaptureSelectTM (ThermoFisher Scientific) иммобилизовали на биосенсорах стрептавидина (SA) (FortéBio), после чего строили стандартную кривую путем оценки сдвига связывания в серии разведений у четко определенной эталонной партии очищенного гомологичного полипептида. Затем измеряли сдвиг связывания предварительно разведенных собранных надосадочных жидкостей культур (10- и 30-кратно разведенных в буфере для кинетического анализа (FortéBio)), содержащих полипептиды по настоящему изобретению, и с помощью построенной стандартной кривой устанавливали концентрацию полипептидов.

Содержание тримеров полипептидов в надосадочной жидкости культуры и очищенных полипептидов оценивали с помощью анализа многоуглового светорассеяния в сочетании с эксклюзионной хроматографией (SEC-MALS) с применением системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) серии Infinity 1260 (Agilent). 40 мкг каждого очищенного полипептида прогоняли (1 мл/мин.) через колонку TSKgel G3000SWxl (Sigma-Aldrich), и молярную массу элюированного материала измеряли с помощью детектора многоуглового рассеяния света miniDAWN Treos и дифференциального рефрактометра Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Данные анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6 (Wyatt Technology), а расчеты молекулярной массы производили, исходя из сигнала показателя преломления.

Правильное сворачивание очищенных полипептидов по настоящему изобретению оценивали с помощью ELISA (значения EC_{50} связывания с антителами).

Для этого полипептиды стеблевого домена наносили покрытием в концентрации 10 нМ и инкубировали с серией разведений моноклонального антитела (mAb) CR9114 (которое описано в WO2013/007770) с применением 70 нМ в качестве начальной концентрации. Связывание с антителами определяли посредством инкубации с конъюгированным с HRP вторичным антителом к человеческому Fc (мышинное антитело к человеческому IgG, Jackson ImmunoResearch) и визуализировали посредством добавления субстрата POD. Считывание проводили с применением многорежимного планшет-ридера EnSight™ (PerkinElmer). Значения EC₅₀ рассчитывали с применением программного пакета Spotfire (Tibco Software Inc.).

Термостабильность очищенных полипептидов определяли посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) посредством контроля флуоресцентного излучения оранжевого красителя Sypro (ThermoFisher Scientific), добавленного к раствору полипептида массой 6 мкг. При постепенном повышении температуры с 25°C до 95°C (60°C в час) полипептиды разворачиваются, а флуоресцентный краситель связывается с экспонированными гидрофобными остатками, что приводит к характерному изменению излучения. Кривые плавления измеряли с применением устройства ViiA7 для ПЦР в реальном времени (Applied BioSystems) и значения T_{m50} рассчитывали с помощью пакета программного обеспечения Spotfire (Tibco Software Inc.). Значения T_{m50} представляют собой температуру, при которой развернулось 50% белка, и, таким образом, являются мерой температурной стабильности полипептидов.

Результаты и вывод

Уровень экспрессии полипептидов и содержание тримеров определяли для двух независимых трансфекционных сред ExpiCHO объемом 70 мл в день 9 после трансфекции (фигура 2A). Все полипептиды хорошо экспрессировались. Полипептид UFV180088, полученный из H3N2 A/Hong Kong/1/68, экспрессировался на уровне ~700 мг/л надосадочной жидкости культуры. Полипептиды UFV180089 и UFV180090, схожие по структуре с полипептидом UFV180088 и содержащие дополнительные изменения в поверхностных аминокислотах (т. е. изменение на поверхности для более близкого сходства с HA H7): L367Y, N475D, A476D и E479A, а также изменения L25K, L367Y, N379G, V381L, A476D и E479A, экспрессировались на уровне ~500 мг/л и ~350 мг/л соответственно.

Анализ неочищенной надосадочной жидкости клеточной культуры с помощью аналитической SEC (фигура 2B, левая панель) указывал на наличие четко определенной популяции растворимых тримерных полипептидов (время удерживания ~8,3 минуты). Схожий анализ также указывал, что двухстадийный протокол очистки обеспечивает

5 очень чистый тримерный полипептид (фигура 2B, правая панель). Более того, тримерные полипептиды характеризовались правильным сворачиванием и экспонировали эпитоп нейтрализующего моноклонального антитела CR9114 с широким спектром действия. Это очевидно из результатов ELISA-анализа, демонстрирующих сильное связывание с CR9114 со значениями EC_{50} ниже 1 нМ

10 (фигура 2C). Кроме того, с помощью DSF определяли температуру, при которой разворачивается 50% полипептида. Все полипептиды были термостабильными и характеризовались значениями Tm_{50} 66,6°C, 64,6°C и 60,9°C для UFV180088, UFV180089 и UFV180090 соответственно (фигура 2D).

В заключение необходимо отметить, что описанные в данном примере

15 полипептиды по настоящему изобретению хорошо экспрессировались и очищались из надосадочной жидкости клеточной культуры в виде правильно свернутых тримерных полипептидов.

Пример 3. *Характеристика одноточечных мутаций в полипептидах по настоящему изобретению (SEC-профили)*

20

Разработанные структуры

Для оценки вклада мутаций, введенных в тримерные полипептиды по настоящему изобретению (схематически показано на фигуре 1), аминокислоты подвергали возвратной мутации по типу замены на исходные аминокислоты в остане

25 штамма A/Hong Kong/1/1968 (таблица 1, фигура 3A), начиная с полипептида UFV 180141 (характеризующегося всеми признаками UFV180088, т. е. делецией головной области, начиная с аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно (т. е. делеция 47-306), введенной тримеризационной областью в домене HA2 в положениях 405-419 (следует отметить, что введенная последовательность

30 GCN4 немного отличается от UFV180088: т. е. ${}_{405}RMKCIEDKIEEIESK_{419}$ (SEQ ID NO: 11)), содержащего цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422 (с образованием внутрипротомерного дисульфидного мостика), содержащего Q в положении 329 (устойчивость к расщеплению протеазами), и при

этом аминокислотой в положении 355 является W; и аминокислотой в положении 378 является T, и аминокислотой в положении 379 является N, и аминокислотой в положении 381 является V; и содержащего гликановый мотив в положениях 401-403) и содержащего цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408 (в последовательности GCN4), с образованием межпротомерного дисульфидного мостика, и содержащего M в положении 388, E в положении 31 и V в положении 34, I в положениях 380 и 432, S в положении 392, T в положении 395, S в положении 399 и N в положении 435 и Y в положении 439). Как и UFV180088, полипептид UFV180141 был усечен после аминокислоты в положении 506. Тем не менее, UFV180141 не содержит дополнительного мотива гликозилирования в положениях 393-395, пролина, стабилизирующего В-петлю, в положении 405 и несет 399S вместо 399P. Кроме того, UFV180088 содержал С-концевую метку EPEA (SEQ ID NO: 25), тогда как UFV180141 содержал другую С-концевую метку.

Исключением является мутация C408Q, которая не является возвратной мутацией в НЗ дикого типа, но которая была произведена в форме возвратной мутации по типу замены на введенную последовательность тримеризационного домена GCN4 (введенную в положения 405-419). Влияние отсутствия конкретных мутаций оценивали с помощью аналитической SEC.

Альтернативным подходом для оценки положительного эффекта выбранных мутаций является их поэтапное введение в полипептид минимальной структуры, т. е. UFV180647, характеризующийся следующими признаками: делецией головной области, начиная с аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно (т. е. делецией 47-306), введенной тримеризационной областью в домене HA2, т. е. ${}_{405}\text{RMKCIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 11), введенной в положения 405-419; цистеином в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422 (с образованием внутрипротомерного дисульфидного мостика), содержащей Q в положении 329 (устойчивый к расщеплению протеазами), и где аминокислотой в положении 355 является W; аминокислотой в положении 378 является T, аминокислотой в положении 379 является N, а аминокислотой в положении 381 является V; и содержащей гликановый мотив в положениях 401-403 и содержащей цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408 (с образованием межпротомерного

дисульфидного мостика), и содержащей М в положении 388. Конструкции с добавленными мутациями анализировали с помощью аналитической SEC и сравнивали с полипептидом минимальной структуры (таблица 2, фигура 3С).

- 5 **Таблица 1.** Обращение выбранных мутаций назад в остатки A/Hong Kong/1968 дикого типа в стабилизированном тримерном полипептиде UFV180141

№ UFV	Мутация(мутации)
UFV180141	Как описано выше
UFV180192	C398E, C408Q (межпротомерный дисульфидный мостик)
UFV180193	W355H
UFV180194	Делеция GCN4
UFV180195	C310K, C422S (внутримолекулярный дисульфидный мостик)
UFV180196	T378N, N379G, V381L (мутации А-спирали)
UFV180197	I380K, I432E
UFV180198	I380K
UFV180199	I432E
UFV180200	M388T
UFV180201	N401E, A402V, T403E (В-петлевой гликан)
UFV180202	T395I
UFV180203	N435H
UFV180204	Y439L
UFV180205	E31D, V34I
UFV180206	S392F
UFV180207	S399F

Таблица 2. Постадийное введение выбранных мутаций в полипептид минимальной структуры UFV180647

№ UFV	Мутации
UFV180647	Как описано выше
UFV181034	K380I, E432I
UFV181036	K380I, E432I, H435N
UFV181038	K380I, E432I, H435N, L439Y
UFV181040	Стабилизированная В-петля (F392S, H393N, I395T, F399P, R405P)

UFV181042	K380I, E432I, стабилизированная В-петля (F392S, H393N, I395T, F399P, R405P)
------------------	---

Экспрессия белка в клетках Expi293F млекопитающих

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, приведенные в таблице 1 и таблице 2, синтезировали так, как описано в примере 2. Полипептиды, включающие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга и очистки, получали в эукариотической суспензионной клеточной линии Expi293F в микромасштабе (200 мкл). Вкратце: клетки подвергали временной трансфекции с применением ДНК промышленного типа в 96-луночных планшетах с лунками глубиной в половину высоты планшета (System Duetz) при плотности клеток, составляющей $2,5 \times 10^6$ в. ч./мл с применением набора для трансфекции ExpiFectamine 293 (Gibco, ThermoFisher Scientific) и инкубировали во встряхиваемых колбах, содержащих среду для экспрессии Expi293 (Gibco, ThermoFisher Scientific), при 37°C, 250 об/мин., 8% CO₂ и 75% влажности. Образцы надосадочной жидкости клеточной культуры, содержащие секретируемые полипептиды, собирали на 3-й день и осветляли посредством центрифугирования (10 мин. при 400 x g) с последующей фильтрацией (96-луночные фильтровальные планшеты, мембрана из PVDF толщиной 0,22 мкм, Corning).

Анализ надосадочной жидкости культуры

Затем оценивали содержание полипептидов по настоящему изобретению в собранных образцах клеточной культуры Expi-293 с помощью SEC-анализа на системе для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) серии Infinity 1260 (Agilent). Объем впрыска, равный 100 мкл надосадочной жидкости культуры, прогоняли (1 мл/мин.) через колонку с гелем TSK G3000SWxl (Sigma-Aldrich) и элюирование отслеживали с помощью УФ-детектирования (фигура 3А). Альтернативно, образцы анализировали с помощью сверхвысокопроизводительной жидкостной хроматографии (UHPLC) с применением системы Vanquish (ThermoFisher Scientific) с колонкой BEH 200A (Waters, объем впрыска 40 мкл, поток 0,35 мл/мин.), а элюированные фракции отслеживали с помощью детектора рассеяния света Helios (Wyatt Technologies, фигура 3С). SEC-профили анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6 (Wyatt Technology). Время элюирования и примерный пик (высота и форма) SEC-профилей визуализировали на фигуре 3В и фигуре 3D.

Результаты и вывод

Подгруппа возвратных мутаций, по-видимому, является вредной для экспрессии полипептидов стеблевого домена, что, например, было показано на UFV180193 (возвратная мутация W355H), UFV180194 (делеция GCN4), UFV180195 (делеция внутримолекулярного дисульфидного мостика) и UFV180199 (возвратная мутация I432E), тогда как другие возвратные мутации были вполне допустимы (фигуры 3А и 3В).

Полипептиды без стабилизирующих мутаций, введенных у UFV180088 (таблица 2), демонстрировали значимые улучшения в уровне экспрессии минимального тримерного полипептида стеблевого домена при дополнительном добавлении мутаций по настоящему изобретению (в структуру UFV180088). Например, как показано на фигуре 3С, тримерный пик полипептида UFV1801034 сдвигался во времени элюирования и увеличивался по высоте при введении мутаций по типу замены K380I, E432I (фигура 3D). Постепенное добавление стабилизирующей мутации в В-петлю (UFV181042: F392S, H393N, I395T, F399P, R405P) дополнительно увеличивало экспрессию тримерного полипептида.

В данном примере продемонстрировано, что по меньшей мере следующие аминокислотные положения (например, мутации): т. е. (мутация по типу замены на) W в положении 355 и/или (мутация по типу замены на) T в положении 378, (мутация по типу замены на) N в положении 379 и (мутация по типу замены на) V в положении 381 и/или (мутация по типу замены на) I в положении 432 или (мутация по типу замены на) I в положениях 432 и 380, а также мотив гликозилирования в положениях 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401, полезны для получения высоких уровней требуемых растворимых тримерных полипептидов. Добавление стабилизирующей мутации в В-петлю (например, F392S, H393N, I395T и F399P) дополнительно увеличивало экспрессию тримерного полипептида.

Пример 4. Межпротомерный дисульфидный мостик; стабильность полипептида по настоящему изобретению

Разработанные структуры

Для оценки вклада введенных цистеиновых остатков в В-петлю и С-спираль, которые образуют межпротомерные дисульфидные мостики в полипептидах по

настоящему изобретению (схематически показано на фигуре 4), цистеиновые остатки подвергали возвратной мутации по типу замены в их соответствующий остаток дикого типа (глутаминовую кислоту), присутствующий в остове штамма A/Hong Kong/1/1968 (положение 398), и в глутамин (остаток 408), присутствующий во введенной последовательности тримеризационного домена GCN4 (405-419). Влияние отсутствия цистеиновых остатков и последующего дисульфидного мостика оценивали с помощью аналитических SEC, DSF и SDS-PAGE.

Экспрессия, очистка и характеристика белков

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды UFV180192 и UFV180141, получали в микромасштабе в клетках Eхрi293F так, как описано в примере 3, и в среднем масштабе в клетках EхрiCHO так, как описано в примере 2 (~60 мл, сбор на 8-й день). Надосадочную жидкость культуры анализировали с помощью аналитической SEC так, как показано в примере 2, в день сбора продукции (в микромасштабе) или после 1-недельного периода инкубации собранной надосадочной жидкости культуры при 4°C (в среднем масштабе). Из собранных надосадочных жидкостей культур (в среднем масштабе) полипептиды с His-метками очищали по двухстадийному протоколу с применением системы ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare Life Sciences). Во-первых, проводили аффинную хроматографию с иммобилизованным металлом с применением предварительно загруженной колонки для очистки с помощью His-метки cOmplete (Roche), промывали с помощью 1 мМ имидазола и элюировали с помощью 300 мМ имидазола. Во-вторых, проводили эксклюзионную хроматографию с применением колонки SRT-10C SEC-300 (Sepax Technologies) и собирали пиковые фракции тримеров. Термостабильность очищенных белков определяли с помощью DSF (как в примере 2) и чистоту белков оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях путем прогона через 10% Bis-Tris-гель с применением системы Bolt и согласно инструкциям производителя (Invitrogen).

Результаты и вывод

По результатам оценки надосадочной жидкости клеточной культуры с помощью аналитической SEC было видно, что оба полипептида с введенными цистеиновыми остатками (UFV180141) и без (UFV180192) введенных цистеиновых остатков в В-

петлю (в положении 398) и С-спираль (в положении 408) экспрессировали тримерный полипептид в растворе (фигура 4А; левая панель). Полипептид UFV180192 был в большем количестве по сравнению с пептидом UFV180141 в день сбора продукции спустя 3 дня после трансфекции в малом масштабе. Тем не менее, в более высоком масштабе в случае сбора продукции на 8-й день и после хранения надосадочной жидкости, содержащей UFV180192, в течение одной недели при 4°C появлялся второй нетримерный пик (время удерживания ~8,5 минуты), что свидетельствовало о структурной нестабильности конструкции без межпротомерного дисульфидного мостика. (фигура 4А; правая панель). Различия в стабильности подтверждали с помощью DSF-оценки очищенных полипептидов. Полипептид без межпротомерного дисульфидного мостика (UFV180192), разворачивался при 50,8°C, тогда как полипептид с введенными цистеиновыми остатками в положениях 398 и 408 разворачивался при 67,7°C (фигура 4В). По результатам SDS-PAGE-анализа очищенных полипептидов было видно, что полипептид без цистеиновых остатков в положениях 398 и 408 прогонялся, как и ожидалось, до высоты мономера с массой ~40 кДа как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях. В отличие от этого, основную полосу для полипептида с двумя введенными цистеиновыми остатками наблюдали в невосстанавливающих условиях на уровне ~120 кДа, как и ожидалось для связанного ковалентными связями тримера, и в восстанавливающих условиях до ожидаемой высоты мономера с массой ~40 кДа (фигура 4С).

Данные, представленные в данном примере, демонстрируют, что ковалентное связывание мономеров путем введения двух цистеиновых остатков в положение 398 и положение 408 с образованием межпротомерных дисульфидных связей приводило к получению значительно более стабильного растворимого тримерного полипептида.

Пример 5. *Альтернативные замены для положений 355, 380 и 342, 435 и 388*

Разработанные структуры

Альтернативные замены для оптимизации полипептидов по настоящему изобретению тестировали в положении 355 (фигура 5А), в положении 380 и 432 (фигура 5В), в положении 435 (фигура 5С) и в положении 388 (фигура 5D). Экспрессию и сворачивание полипептидов оценивали в надосадочной жидкости клеточной культуры Expi293F.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, синтезировали так, как описано в примере 2. Полипептиды, включающие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга, получали в эукариотических клетках Expi293F в микромасштабе (200 мкл), как описано в примере 3, за исключением полипептидов, описанных на фигуре 5C II и фигуре 5D, которые получали в линии эукариотических клеток ExpiCHO, как описано в примере 2 (в среднем масштабе, соответственно 50 мл и 30 мл).

Анализ надосадочной жидкости культуры

Экспрессию, сворачивание и содержание тримеров полипептидов по настоящему изобретению оценивали с помощью гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции (AlphaLISA, фигуры 5A, 5B, 5C) в соответствии с инструкциями производителя (PerkinElmer). Этот анализ равновесия в растворе и при связывании основан на успешном связывании как донорной, так и акцепторной гранулы с полипептидом. При непосредственной близости в результате лазерного облучения донорной гранулы при 680 нм образуется поток синглетного кислорода, инициирующий химические события в близлежащей акцепторной грануле, что приводит к хемилюминесцентному испусканию при 615 нм. Уровни экспрессии измеряли с помощью системы Expression-AlphaLISA путем одновременного добавления никелевых донорных гранул (с антителами к His-метке) и акцепторных гранул с антителами к FLAG-метке в надосадочную жидкость клеточной культуры. Данная система Expression-AlphaLISA позволяла распознавать С-концевой Flag-линкер-His-метка независимо от сворачивания полипептидов. Правильное сворачивание полипептидов оценивали в Binding-AlphaLISA путем одновременного добавления в надосадочную жидкость клеточной культуры никелевых донорных гранул, человеческого IgG CR9114 (2 нМ) или CT149 (1 нМ) и акцепторных гранул с антителами к человеческому IgG. Сигнал можно было получить лишь в том случае, если полипептид правильно сворачивается и допускает связывание с IgG, специфических к НА вируса гриппа.

Для определения содержания тримерных полипептидов, присутствующих в надосадочной жидкости культуры, применяли систему trimer-AlphaLISA. В ее основе лежат человеческие IgG, такие как CT149 или CR9114, которые специфически связываются с мономерным НА. При добавлении к НА смеси 1:1 меченых различными

метками IgG CT149 или CR9114 сигнал AlphaLISA можно детектировать лишь в том случае, если присутствует мультимер, позволяющий связываться по меньшей мере с двумя антителами, но не мономер, позволяющий связываться лишь с одним антителом. Trimer-AlphaLISA проводили путем одновременного добавления в надосадочную жидкость культуры донорных гранул со стрептавидином и акцепторных гранул с IgG к DIG в присутствии биотинилированных и меченных DIG-меткой IgG CT149 или CR9114 (в каждом случае по 0,5 нМ, соотношение 1:1).

Во всех случаях систем AlphaLISA детекторные гранулы добавляли в концентрации 10 мкг/мл. Во избежание эффекта высокой дозы надосадочные жидкости культур тестировали при различных разведениях, в соответствии с инструкциями производителя. Считывание проводили через 2 часа после инкубации при комнатной температуре в темноте с применением многорежимного планшет-ридера EnSight™ (PerkinElmer). Все данные нормализовали к их соответствующим эталонным конструкциям, которые были приняты за 100%.

Уровень экспрессированного полипептида в надосадочной жидкости клеточной культуры также оценивали посредством биослойной интерферометрии с применением платформы OCTET в соответствии с инструкциями производителя (FortéBio). Вкратце: стандартную кривую строили с применением биосенсоров на основе антител к HIS (HIS2) (FortéBio) посредством оценивания сдвига связывания в серии разведений строго определенной эталонной партии очищенного гомологичного полипептида. Затем измеряли сдвиг связывания предварительно разведенных (в буфере для кинетического анализа, FortéBio) образцов надосадочной жидкости клеточной культуры, содержащих полипептиды по настоящему изобретению, и концентрацию полипептидов рассчитывали с применением построенной стандартной кривой (фигуры 5C II, 5D). Содержание полипептидов по настоящему изобретению в сборах культур дополнительно охарактеризовывали с помощью аналитической SEC в HPLC (фигура 5C II) и UHPLC (фигура 5D, объем впрыска: 10 мкл), как описано в примере 4. После очистки выбранных полипептидов UFV171004 и UFV171197 связывание с моноклональными антителами CR9114 и CT149 оценивали с помощью ELISA. Наконец, термостабильность данных очищенных полипептидов определяли с помощью DSF (оба способа описаны в примере 2, на фигуре 5C II).

Результаты и вывод

Введение триптофана (W) в положение 355 в полипептиде UFV161739 приводило к сильному увеличению экспрессии и связывания с антителами CR9114 и CT149 по сравнению с конструкцией с гистидином дикого типа в положении 355 (UFV161333). Одновременное введение 355W и изолейцина (I) в положение 482 (UFV161800) дополнительно увеличивало экспрессию и связывание с антителами по сравнению с конструкцией с одной лишь мутацией 355W. Одновременное введение фенилаланина (F) в положения 355 и 482I хорошо переносилось, но приводило к меньшему увеличению экспрессии и связывания с антителами по сравнению с контрольной конструкцией с соответствующими остатками дикого типа в положениях 355 и 482 (фигура 5A).

Для положений 380 и 432 оценивали множество аминокислотных остатков и их комбинации. В целом, протестированные аминокислотные замены хорошо переносились с минимальными эффектами на уровень экспрессии, содержание тримеров и связывание с антителами (фигура 5B). Одновременное введение изолейцина в положения 380 и 432 в полипептиде (UFV171004) давало наивысший выход тримеров (215%) по сравнению с эталоном.

Было продемонстрировано, что в положении 435 хорошо переносились четыре различных аминокислотных замены (K, N, Q, R). Соответствующие полипептиды и эталонный полипептид UFV170611, содержащий гистидин дикого типа в положении 435, демонстрировали сравнимые уровни по результатам AlphaLISA в отношении экспрессии, содержания тримеров и связывания с моноклональными антителами CR9114 и CT149 (фигура 5C I). Дополнительное изучение характеристик полипептидов с заменами 435N (UFV171004) и 435R (UFV171197) подтвердило схожие уровни экспрессии (OCTET), SEC-профили и силу связывания с mAb CR9114 и CT149 (ELISA). Тем не менее, полипептид с аспарагином (N) в положении 435 характеризовался более высокой термостабильностью при $\sim 4^{\circ}\text{C}$ по сравнению с полипептидом с заменой аргинина (R) в данном положении (фигура 5C II).

Полипептиды с аминокислотными заменами в положении 388, данное положение находится в верхней части А-спирали (M, V, I, L, F, Y, W, H, K и R), оценивали в отношении уровня экспрессии (Octet) и содержания тримеров с помощью аналитической SEC. Уровни экспрессии ранжировали от метиониновой замены (UFV180088) с 475 мг/л до менее подходящей аргининовой замены с уровнем экспрессии 192 мг/л. На всех SEC-профилях был виден тримерный полипептид, что

указывало на то, что все оцениваемые остатки в положении 388 были переносимыми и не влияли на общую структуру (фигура 5D). Все полипептиды с аминокислотными заменами в положении 388 элюировались с более коротким временем удерживания по сравнению с эталонным полипептидом (UFV180088) из-за разницы в длине С-концевой метки: Flag-линкер-His-метки и С-метки соответственно.

В своей совокупности, одиночные альтернативные аминокислотные замены в различных оптимизационных областях полипептидов по настоящему изобретению были возможны и хорошо переносились; уровень экспрессии, содержание тримеров и сворачивание белка затрагивались лишь минимально.

Пример 6. Определение делеции головного домена HA1

Разработанные структуры

Полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются делецией головной области от положения 47 до аминокислоты в положении 306 включительно (схематично показано на фигуре 1). В данном примере исследовали альтернативные делеции и линкеры, полученные из головного домена между концами HA₁, которые возникают после введения делеции (схематически показано на фигуре 6). Во-первых, оценивали альтернативные положения делеций для верхней нити HA₁ (таблица 3). Концы HA₁, присутствующие в эталонной структуре (UFV161908, с делецией от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно, замещенной на линкер GPGS), показаны серым.

Таблица 3. Соединение концов HA₁ после делеции головного домена

№ UFV	Верхняя нить HA1					Соединение					Нижняя нить HA1			
A/Hong Kong/1/68	E	L	V	Q	S	S	S	T	G	K	K	Y	V	K
№ положения AA	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	307	308	309	310
Аминокислота WT	E	L	V	Q	S	S	S	T	G	K	K	Y	V	K
UFV161908*	E	L	V	Q	S	G	P	G	S	-	K	Y	V	K
UFV170636	E	L	V	Q	S	-	-	-	-	-	K	Y	V	K
UFV170637	E	L	V	Q	S	S	-	-	-	-	K	Y	V	K
UFV170638	E	L	V	Q	S	S	S	-	-	-	K	Y	V	K
UFV170639	E	L	V	Q	S	S	S	T	-	-	K	Y	V	K
UFV170640	E	L	V	Q	S	S	S	T	G	-	K	Y	V	K

* Эталон

Во-вторых, альтернативные положения делеций для верхней нити HA₁ объединяли с альтернативными положениями делеции для нижних нитей HA₁ (таблица 4).

- 5 **Таблица 4.** Альтернативное соединение между концами HA1 после удаления головного домена

<i>№ UFV</i>	<i>Верхняя нить HA1</i>			<i>Соединение</i>								<i>Нижняя нить HA1</i>			
A/Hong Kong/1/68	V	Q	S	S	S	T	G		G	A	C	P	K	Y	V
№ положения AA	43	44	45	46	47	48	49		303	304	305	306	307	308	309
Аминокислота WT	V	Q	S	S	S	T	G		G	A	C	P	K	Y	V
UFV160653*	V	Q	S	G	P	G	S		-	-	-	-	K	Y	V
UFV160764	V	Q	S	-	-	-	-		-	-	-	P	K	Y	V
UFV160765	V	Q	S	-	-	-	-		-	-	C	P	K	Y	V
UFV160766	V	Q	S	-	-	-	-		-	A	C	P	K	Y	V
UFV160674	V	Q	S	-	-	-	-		G	A	G*	P	K	Y	V
UFV160675	V	Q	S	-	-	-	-		G	A	C	P	K	Y	V
UFV160767	V	Q	S	S	-	-	-		-	A	C	P	K	Y	V
UFV160768	V	Q	S	S	-	-	-		-		C	P	K	Y	V
UFV160769	V	Q	S	S	S	-	-		-	A	C	P	K	Y	V
UFV160770	V	Q	S	S	S	-	-		-	-	C	P	K	Y	V
UFV160771	V	Q	S	S		-	-		-	-	-	P	K	Y	V
UFV160772	V	Q	S	S	S	-	-		-	-	-	P	K	Y	V

* Эталон, ** Точечная мутация по типу замены цистеина на глицин

- 10 В-третьих, исследовали применение гомологичных линкеров, содержащих аминокислотные последовательности из удаленного головного домена, для соединения концов HA₁ (таблица 5).

Таблица 5. Альтернативные соединения, происходящие из остатков цепей из удаленного головного домена

<i>№ UFV</i>	<i>Верхняя нить HA1</i>					<i>Соединение</i>					<i>Нижняя нить HA1</i>			
A/Hong Kong/1/68	E	L	V	Q	S	S	S	T	G	K	K	Y	V	K
№ положения AA	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	307	308	309	310
Аминокислота WT	E	L	V	Q	S	S	S	T	G	K	K	Y	V	K
UFV160321*	E	L	V	Q	S	G	G	G	G	-	K	Y	V	K
UFV160403	E	L	V	Q	S	N	P	H	R	-	K	Y	V	K
UFV160404	E	L	V	Q	S	G	D	P	H	-	K	Y	V	K
UFV160405	E	L	V	Q	S	N	G	G	S	-	K	Y	V	K

UFV160406	E	L	V	Q	S	G	G	S	N	-	K	Y	V	K
UFV160407	E	L	V	Q	S	G	S	N	A	-	K	Y	V	K
UFV160408**	E	L	V	Q	S	G	P	G	S	-	K	Y	V	K
UFV160409	E	L	V	Q	S	G	S	G	F	-	K	Y	V	K
UFV160410	E	L	V	Q	S	G	S	G	-	-	K	Y	V	K
UFV160411	E	L	V	Q	S	G	G	-	-	-	K	Y	V	K
UFV160412	E	L	V	Q	S	G	G	S	-	-	K	Y	V	K
UFV160413	E	L	V	Q	S	S	G	S		-	K	Y	V	K
UFV160414	E	L	V	Q	S	H	P	S	T	-	K	Y	V	K
UFV160415	E	L	V	Q	S	I	P	N	I	-	K	Y	V	K
UFV160416	E	L	V	Q	S	G	L	S	S	-	K	Y	V	K
UFV160417	E	L	V	Q	S	K	P	G	D	-	K	Y	V	K
UFV160418	E	L	V	Q	S	D	A	P	I	-	K	Y	V	K
UFV160419	E	L	V	Q	S	T	P	N	-	-	K	Y	V	K
UFV160420	E	L	V	Q	S	T	P	N	G	-	K	Y	V	K

* Эталон, ** Соединение, применяемое в качестве эталонной конструкции для конструкций из таблицы 1 и таблицы 2

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ надосадочной жидкости культуры

5 Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга продуцировали в микромасштабе в эукариотических клетках Expi293F (200 мкл), как описано в примере 3. Экспрессию, содержание тримеров и сворачивание (связывание с mAb либо CR9114, либо CT149) полипептидов оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 5. Все данные нормализовали к их соответствующим эталонным конструкциям UFV161908 (фигура 6A), UFV160653 (фигура 6B) и UFV160321 (фигура 6C), которые были приняты за 100%.

15 Результаты и вывод

20 Варьирование положения делеции головного домена в верхней нити HA₁ оказывало лишь минимальные эффекты на уровень экспрессии, выход тримеров и сворачивание белка (т. е. связывание с антителами) (фигура 6A). В отличие от этого, экспрессия полипептидов, которые включали альтернативное положение делеции как в верхней, так и в нижней нити HA₁, демонстрировала до ~50% снижения уровней экспрессии и до ~70% снижения связывания с антителом CT149 (фигура 6B). Это свидетельствовало о том, что в пределах тестируемого диапазона положений, в

частности, положении, в котором делеции подвергнута нижняя нить НА₁, затрагивались как экспрессия, так и сворачивание полипептидов.

Альтернативный подход к прямому соединению оставшихся концов НА₁ (например, N-концевого фрагмента НА₁ и С-концевого фрагмента НА₁) после
 5 удаления головного домена заключается в соединении через гомологичную линкерную последовательность. Как показано в таблице 5, с этой целью верхнюю нить НА₁ (остаток 45) соединяли с нижней нитью НА₁ (остатком 307) посредством короткой последовательности, полученной из соответствующего головного домена НА НЗ. Это приводило к получению полипептидов с уровнями экспрессии, варьирующимися от
 10 33% до 223% по сравнению с эталоном (фигура 6С). Аналогично, связывание с антителом СТ149 характеризовалось большим разбросом, при этом наблюдались значения в диапазоне от 57% до 350% по сравнению с эталоном. Полипептиды, которые хорошо экспрессировались, в большинстве случаев также характеризовались высоким связыванием с антителами.

15 В целом, образование тримерных и правильно свернутых полипептидов стеблевого домена посредством делеции головного домена НА не зависело от одного точного положения делеции. Успешно были получены непосредственное соединение концов НА₁ и вариации положения делеции как в верхней, так и в нижней нити НА₁. Альтернативно, также возможно было соединение конца НА₁ путем введения
 20 гомологичного аминокислотного линкера, полученного из головного домена, а для повторного соединения концов НА₁ после удаления головного домена можно было подобрать множество пептидов с различным составом последовательности и различной длиной (по меньшей мере от 2 до 5 аминокислот).

25 Пример 7. *Оптимизация В-петли в полипептидах по настоящему изобретению*

Разработанные структуры

30 После делеции головного домена НА₁ становится открытой В-петля (фигура 1В и С, включающая аминокислоты 385-404) полипептида стеблевого домена НА. Для частичной защиты данной зоны от иммунной системы и дополнительной стабилизации петли вводили мотивы гликозилирования и остатки пролина (фигура 7). Мотивы гликозилирования (NхТ) вводили в положения 401-403 с помощью мутаций Е401N и Е403Т для N-связанного гликозилирования в положении 401 и тестировали в

комбинации с N-связанными гликановыми мотивами в положениях 398-400 путем мутации S398N (в результате получался мотив NxS), или в положении 392-394 путем мутации S392N и Q394T, или в положении 393-395 путем мутации H393N и I395T (в
 5 обоих случаях в результате получался мотив NxT). Пролиновые замены, которые могут снизить склонность к спирализации в последовательности В-петли, вводили однотоочечными мутациями в любом из положений в диапазоне от 385 до 406 и двойными точечными мутациями в 392 вместе с любым из 396 или 398.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга, продуцировали в микромасштабе в линии эукариотических клеток Expi293F (200 мкл), как описано в примере 3. Экспрессию,
 15 содержание тримеров и сворачивание (связывание с mAb CR9114, CT149 (которое описано у Wu et al. (2015)) и SD15013 (содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39) полипептидов оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 5 (связывание с SD15013 оценивали с применением акцепторных гранул с антителами к His и донорных гранул со стрептавидином в
 20 присутствии SD15013 в концентрации 2 нМ). Надосадочные жидкости клеточных культур анализировали с помощью аналитической SEC, как описано в примере 2, в день сбора продукции.

Все данные нормализовали к их соответствующим эталонным конструкциям UFV161686 (фигура 8A), UFV161333 (фигура 7B и C) и UFV171187 (фигура 7D),
 25 которые были приняты за 100%.

Результаты и вывод

Введение одного мотива гликозилирования в В-петлю путем мутации остатков в положениях 401, 402 и 403 на N, A и T соответственно для N-связанного гликозилирования в положении 401 приводило к двукратному увеличению уровня
 30 экспрессии полипептида. Аналогично, наблюдали огромное увеличение связывания с антителами CR9114 и CT149, соответственно в 5 и 7 раз, и однодоменным SD15013 (в 10 раз) (фигура 7A).

Введение пролинов в В-петлю не затрагивало уровень экспрессии полипептидов; значения варьировали от 94% до 128% относительно эталонной

конструкции (фигура 7B). В отличие от этого, добавление остатков пролина в положениях 386, 387, 388 и 389 давало негативный эффект для связывания с антителами. Минимальное связывание с CR9114, CT149 и SD15013 свидетельствовало о том, что на сворачивание полипептидов оказывалось отрицательное влияние при введении пролина на N-конце В-петли. Введение одного пролина в любое из положений 390-405 или двух пролинов в положениях 392 и 396 или положениях 392 и 398 приводило к ~40% увеличению связывания с CR9114, тогда как связывание с CT149 оставалось относительно схожим или снижалось (~65% по сравнению с эталоном). SD15013 характеризовалось наибольшим разбросом среди данных конструкций с относительным связыванием в диапазоне от ~50% до ~150% по сравнению с эталоном. Введение двух остатков пролина переносилось хорошо, а связывание с CR9114, CT149 и SD15013 в целом обнаруживалось как среднее от значений связывания с антителами для единичных введений пролина. Исключение наблюдали в случае связывания SD15013 с UFV161708, который характеризовался 147% связыванием, тогда как в случае одиночных мутаций в положениях 392 и 396 наблюдали снижение связывания (64% и 75% относительно эталона).

Введение второго мотива гликозилирования в В-петлю хорошо переносилось (фигура 7C); оба полипептида с дополнительным мотивом в положении 393 (UFV161715) или 398 (UFV161721) демонстрировали относительно схожий уровень экспрессии по сравнению с эталоном, увеличение связывания с CR9114 (~145%), незатронутое связывание с CT149 (~90%) и небольшое снижение в связывании с SD15013 (~60%).

Одновременное введение остатков пролина и/или второго мотива гликозилирования (в положениях 392-395) приводило к получению полипептидов, экспрессия которых была приблизительно в 2 раза ниже, чем в случае эталона, который содержал единственный мотив гликозилирования в положениях 401-403 и не содержал пролина (фигура 7D). Связывание с антителами (CR9114 и CT149) практически не затрагивалось, при этом наблюдали падение в случае SD15013 (~48-88% относительно эталона). Поскольку одновременное гликозилирование N398 и N401 из-за их близости было маловероятным, предпочтительным был дополнительный гликан по N393 или N392.

По результатам SEC-MALS-анализа надосадочных жидкостей клеточных культур EXPI-293, содержащих полипептиды по настоящему изобретению с одним N-связанным гликановым мотивом (UFV180208) или двумя N-связанными гликановыми

мотивами и двумя остатками пролина (UFV180217), был виден четкий пик, соответствующий соответствующему тримерному полипептиду (фигура 7E).

Мутации в В-петле в форме стабилизирующих остатков пролина и дополнительных мотивов N-связанного гликозилирования переносились хорошо. Хотя и наблюдались различия в экспрессии и связывании с антителами (особенно в случае связывания с SD15013), введение пролина(пролинов), за исключением N-концевой области В-петли (положения 392-389), и второго мотива N-связанного гликозилирования было возможным без затрагивания сворачивания и тримеризации белка.

Пример 8. *Мотив N-связанного гликозилирования в положении 38 полипептидов по настоящему изобретению*

Разработанные структуры

Для оценки влияния консервативного мотива гликозилирования рядом с эпитопом CR9114 (положение 38) на экспрессию и сворачивание производили сравнение полипептида, содержащего мотив 38-NAT-40 дикого типа для N-связанного гликозилирования (UFV170282), с полипептидом, у которого мотив был подвергнут нокауту с помощью точечной мутации T40I (UFV170278).

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ, очистка и характеристика надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, экспрессировали и очищали так, как описано в примере 2. Уровень экспрессированного полипептида в надосадочной жидкости культуры оценивали с помощью биослойной интерферометрии с применением платформы ОСТЕТ, как описано в примере 2, с использованием иммобилизованного mAb CT149 и 25-кратно разведенной надосадочной жидкости клеточной культуры, содержащей полипептид по настоящему изобретению. Силу связывания антител с очищенными полипептидами оценивали с помощью ELISA (EC_{50}), как описано в примере 2.

Результаты и вывод

При удалении мотива N-связанного гликозилирования в положении 38 (UFV170278) уровень экспрессии снижался на ~50% по сравнению с полипептидом с присутствующим мотивом (UFV170282), тем не менее, оба полипептида оставались

хорошо экспрессирующимися полипептидами со значениями выше 255 мг на литр надосадочной жидкости культуры. Как было определено с помощью ELISA, сила связывания с антителом значимо не различалась между двумя полипептидами, о чем свидетельствовали значения $EC_{50} \sim 1$ нМ у CR9114 и CT149 (фигура 8А и В).

5 В заключение необходимо отметить, что при удалении мотива N-связанного гликозилирования в положении 38, хотя и наблюдалось снижение уровня экспрессии, оно хорошо переносилось и, судя по всему, не затрагивало сворачивание полипептида.

10 Пример 9. *Альтернативные положения внутримолекулярного дисульфидного мостика между HA1 – HA2*

Разработанные структуры

15 Протомеры тримерных полипептидов стеблевого домена по настоящему изобретению предпочтительно стабилизировались с помощью вводимого дисульфидного мостика, ковалентно связывающим нижнюю нить HA₁ (положение 310) с С-спиралью нити HA₂ (положение 422). Альтернативные варианты для данного внутрипротомерного дисульфидного мостика оценивали путем создания небольших сдвигов в точном положении соответствующих цистеиновых остатков (положениях 311/422 и 308/418). В дополнение к дисульфидному мостику 310/422
20 оценивали вторую пару цистеиновых остатков для соединения HA₁ (положения 26) с С-концевой частью С-спирали HA₂ (положение 433).

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ надосадочной жидкости культуры

25 Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды экспрессировали в клетках Expi-293, как описано в примере 2, за исключением того, что вместо микромасштаба (200 мкл) эксперимента культуры выращивали в среднем масштабе (30 мл). Уровень экспрессии и сворачивание (связывание с mAb CR9114 и CT149) полипептидов по
30 настоящему изобретению оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 5, с применением CR9114 и CT149 в концентрациях, равных 2,5 нМ и 1,25 нМ соответственно.

Результаты и вывод

Перерасположение цистеиновых остатков с остатка 310 на 311 или на 308 (в комбинации с перерасположением цистеина в положении 422 на 418) хорошо переносилось и оказывало лишь минимальное влияние на уровень экспрессии и сворачивание полипептидов, что было видно по связыванию с антителами (фигура 9А). Введение второго дисульфидного мостика в область ниже дисульфидного мостика 310-422 было в принципе возможным, что было видно по незатронутому уровню экспрессии, однако резкое снижение связывания с CR9114 и CT149 (2% и 48% относительно эталона соответственно) свидетельствовало о том, что на сворачивание требуемых консервативных эпитопов стеблевого домена оказывался отрицательный эффект (фигура 9В).

Пример 10. *Альтернативные положения межпротомерных дисульфидных мостиков*

Разработанные структуры

Протомеры в полипептидах стеблевого домена НА предпочтительно ковалентно связаны посредством межпротомерного дисульфидного мостика в верхней части тримерного белка НА (фигура 4А). Вводили два цистеиновых остатка: один в В-петлю (положение 398) и один в С-спираль (положение 408), оба из которых образуют пару со стерически близкими цистеинами в соседнем протомере в тримере; т. е. цистеин 398 из протомера 1 образует дисульфидную связь с цистеином 408 из протомера 2, цистеин 398 из протомера 2 образует дисульфидную связь с цистеином 408 из протомера 3, а цистеин 398 из протомера 3 образует дисульфидную связь с цистеином 408 из протомера 1. Альтернативные варианты данной межпротомерной дисульфидной связи исследовали путем создания небольших сдвигов вверх или вниз в точном положении точечных мутаций цистеиновых остатков (фигура 10).

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга, продуцировали в микромасштабе в линии эукариотических клеток Expi293F (200 мкл), как описано в примере 3. Экспрессию, содержание тримеров и сворачивание (связывание с mAb CR9114 или CT149)

полипептидов по настоящему изобретению оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 5.

Результаты и вывод

Полипептиды с введенными межпротомерными дисульфидами экспрессировались в ~1,8 раза ниже по сравнению полипептидами без данных цистеинов. Тем не менее, разница в тримеризации значительна (фигура 10). Полипептиды с межпротомерными дисульфидами экспрессировались на одном уровне и все проявляли сходно высокие уровни тримеров и аффинности связывания с антителами CR9114 и CT149. Это демонстрирует критическую важность межпротомерного дисульфидного мостика для тримеризации и правильного сворачивания консервативных эпитопов стеблевого домена. Более того, хорошо переносились небольшие изменения в позиционировании межпротомерного дисульфидного мостика.

Пример 11. Альтернативные усечения на С-конце

Разработанные структуры

Гемагглютинин (НА) вируса гриппа представляет собой мембранный белок, который расположен на поверхности вирусной частицы, при этом С-концевая часть белка погружена в вирусную мембрану. В случае растворимых версий полипептидов по настоящему изобретению эктодомен может быть усечен в различных положениях в природной линкерной последовательности (положения 500-513), которая соединяет С-концевую альфа-спираль эктодомена с трансмембранным (ТМ) и цитоплазматическим доменом.

Оценивали альтернативные положения С-концевого усечения (таблица 6).

Таблица 6. Альтернативные С-концевые усечения полипептидов по настоящему изобретению, полученные из эктодомена НА из A/Hong Kong/1/68.

	С-конец последней спирали										природный линкер										ТМ								
	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516
A/HongKong/1/68	H	D	V	Y	R	D	E	A	L	N	N	R	F	Q	I	K	G	V	E	L	K	S	G	Y	K	D	W	I	L
UFV171272	H	D	V	Y	R	D	E	A	L	N	N	R	F	Q	I	K	G	V	E	L	K	S	G	Y	K	D	W	I	
UFV171273	H	D	V	Y	R	D	E	A	L	N	N	R	F	Q	I	K	G	V	E	L	K	S	G	Y	K	D			
UFV171274	H	D	V	Y	R	D	E	A	L	N	N	R	F	Q	I	K	G	V	E	L	K	S	G	Y					

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, перечисленные в таблице 6, синтезировали так, как описано в примере 3, и экспрессировали в суспензионных клеточных культурах EXPI-293 так, как описано в примере 4.

Собранные надосадочные жидкости клеточных культур анализировали в отношении уровней тримерного полипептида с помощью аналитической SEC с применением HPLC, как описано в примере 4А. Правильное сворачивание экспрессированных полипептидов по настоящему изобретению оценивали в надосадочной жидкости клеточной культуры посредством биослойной интерферометрии с применением платформы OCTET (FortéBio), как описано в примере 6. Если кратко, надосадочные жидкости, разведенные в пять раз в буфере для кинетического анализа (FortéBio), оценивали в отношении связывания с биотинилированными человеческими моноклональными антителами CR9114 или CT149 (10 мкг/мл), загруженными на стрептавидиновые биосенсоры (FortéBio). Производили построение кривой в течение первых 100 секунд стадии связывания для расчета значений K_{ON} , а сами кривые строили по модели 1:1. Имитационный образец включали в качестве отрицательного контроля.

С-концевые усечения между остатками 501 и 513 хорошо переносились с лишь незначительными эффектами, оказываемыми на уровне тримеров и экспрессии, а также на связывание с антителами. Усеченные полипептиды демонстрировали сравнимые паттерны тримерных пиков в SEC-анализе (фигура 11A) и хорошую или улучшенную K_{ON} в отношении связывания с CR9114 и CT149 в анализе Octet (фигура 11B). Усечения (после положения 499 в UFV171280), достигающие С-концевой спирали эктодомена, приводили к явному падению уровней экспрессии тримеров и связывания с антителами, как было видно по результатам SEC- и OCTET-анализа.

Пример 12. *Альтернативные мутации в А-спирали полипептидов по настоящему изобретению*

Разработанные структуры

5 Позиционирование и сворачивание С-концевой части А-спирали полипептидов по настоящему изобретению имеют решающее значение для правильной репрезентации консервативных эпитопов стеблевого домена. В поиске оптимальной конформации три остатка А-спирали (378, 379 и 381) подвергали возвратной мутации по типу замены в
10 остатки, происходящие в данном положении из НА группы 1 (H1 A/Brisbane/59/07) или НА группы 2 (H3 A/Hong Kong/1/1968). Кроме того, оценивали гипотетическую мутацию G379A, стабилизирующую А-спираль.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ, очистка и характеристика надосадочной жидкости культуры

15 Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга, продуцировали в микромасштабе в линии эукариотических клеток Expi293F (200 мкл), как описано в примере 3. Экспрессию, содержание тримеров и сворачивание (путем связывания 2,5 нМ mAb CR9114 или
20 CT149) полипептидов оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 5. Кроме того, полипептиды экспрессировали в среднем масштабе (50 мл) в клетках EXPICHO, как описано в примере 4, и уровни экспрессии определяли с помощью биослойной интерферометрии, как описано в примере 5, и неочищенную надосадочную жидкость клеточной культуры анализировали с помощью SEC-MALS посредством
25 высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), как описано в примере 3. Полипептиды очищали по двухстадийному протоколу с помощью аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии, как описано в примере 4. Антигенность очищенных полипептидов оценивали с помощью ELISA (значения EC₅₀ для связывания с антителами CR9114 и CT149), а температуру, при которой
30 разворачивается 50% полипептида, определяли с помощью DSF, оба случая описаны в примере 2.

Результаты и вывод

Постепенное увеличение количества полученных из Н1 остатков в положениях 378, 379 и 381 влияло на уровень экспрессии полипептида. Полипептид UFV161448, содержащий все три Н1-подобных остатка, был наименее экспрессирующимся полипептидом (84%), тогда как UFV161451, содержащий Н1-подобные остатки в положениях 379 и 381, был наиболее экспрессирующимся полипептидом (163%). Полипептиды, содержащие гипотетическую мутацию 379А, стабилизирующую А-спираль (UFV161459 и UFV161458), экспрессировались хуже всех (соответственно 42% и 75%). Правильное сворачивание полипептидов оценивали в AlphaLISA. Относительный сигнал для связывания как с CR9114, так и с СТ149 характеризовался большим разбросом. Для полипептида UFV161453 (379N) наблюдали наименьшее связывание: 61% и 24% с CR9114 и СТ149 соответственно. У полипептида UFV161448, который содержал все мутации в направлении Н1 (378Т, 379N и 381V), наблюдали наивысшую степень связывания: 1706% и 841% с CR9114 и СТ149 соответственно (фигура 12А).

Эффект мутаций А-спирали дополнительно изучали в более стабилизированных тримерных полипептидах стеблевого домена UFV171004 и (UFV171116), которые включали, среди прочего, мутацию Н355W и альтернативный межпротомерный дисульфидный мостик (397/408). В трех независимых продуктах ExpiCHO среднего масштаба UFV171004 (который включал остатки Н1 в А-спирали в положениях 378, 379 и 381) экспрессировался на несколько более высоком уровне, чем полипептид UFV171116 (который содержал остатки Н3 в данных положениях).

Аналогично, минимальные различия наблюдали в результатах SEC-MALS-анализа надосадочных жидкостей культур; у обеих конструкций пик, соответствующий фракции тримеров (время удержания ~8 минут), перекрывался по форме и высоте. Связывание с антителами CR9114 и СТ149 в качестве показателя правильного сворачивания белка определяли с помощью ELISA, и его результаты указывали на сильное связывание ($EC_{50} < 0,01$ нМ). Температурная стабильность, определенная с помощью DSF, свидетельствовала о значительном различии между обоими полипептидами. Тогда как 50% полипептида UFV171116 разворачивалось при 66,2°C, полипептид UFV171004 характеризовался значением Tm_{50} 68,0°C (фигура 12В).

В своей совокупности, введение остатков Н1 в А-спираль основанных на Н3 полипептидов стеблевого домена приводило к получению полипептидов, которые были

более термостабильными и характеризовались увеличением связывания с CR9114 и CT149. Различия в связывании с антителами были менее значительными в конструкциях UFV171004 и UFV171116, которые включали, среди прочего, стабилизирующую мутацию H355W.

5

Пример 13. Введение поверхностных мутаций в H7

Разработанные структуры

Тримерные полипептиды стеблевого домена по настоящему изобретению, которые описаны в предыдущих примерах, основаны на HA из вируса гриппа H3 A/Hong Kong/1/1968. Несмотря на высокую степень консервативности в стеблевом домене гемагглютининов H3 и H7 группы 2, несколько поверхностных остатков в области консервативных эпитопов стеблевого домена различаются. В данном примере выбранные остатки, расположенные на поверхности полипептида, поэтапно подвергали мутации по типу замены из остатков H3 (которые присутствуют в эталонных UFV172561 и UFV172562) в соответствующие остатки H7. Эти остатки включали положения в $\beta 2/\beta 3$ -петле (остатки 25 и 27), остатки в A-спирали (остаток 367) и остатки в нижней части полипептида (остатки 475, 476 и 479).

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие C-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга, продуцировали в микромасштабе в линии эукариотических клеток Expi293F (200 мкл), как описано в примере 3. Экспрессию, содержание тримеров и сворачивание (по связыванию с mAb CR9114 и CT149) полипептидов по настоящему изобретению оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 5. Все данные AlphaLISA нормализовали к их соответствующим эталонным конструкциям UFV172561 и UFV172562, которые принимали за 100%. Первая эталонная конструкция включала мутации остатков H1 в положениях 379 и 381, вторая эталонная конструкция включала остатки H3 дикого типа в положениях 379 и 381. Дополнительно надосадочные жидкости культур анализировали с помощью аналитической SEC в день сбора продукции, как описано в примере 2.

Результаты и вывод

Введение Н7-подобных остатков в $\beta 2/\beta 3$ -петлю, А-спираль (включающую Н1-подобные остатки в положениях 379 и 381) и в нижнюю часть стеблевого домена приводило к небольшому снижению экспрессии и выходу тримеров и относительно
 5 небольшому изменению связывания антител ($\pm 20\%$) с тримерными стволовыми полипептидами, что было определено с помощью AlphaLISA. Аналогично, по результатам SEC-анализа неочищенных надосадочных жидкостей клеточных культур наблюдали снижение уровня экспрессии полипептидов, включающих поверхностные мутации в Н7 (фигура 13А).

10 Схожий эффект наблюдали при введении поверхностных мутаций в вариант остова, который включал Н3-подобные остатки в положениях 379 и 381 (фигура 13В).

В своей совокупности, можно модифицировать поверхность полученных из НА Н3 полипептидов стеблевого домена по настоящему изобретению в направлении Н7, особенно при наличии Н1-подобных остатков в верхней части А-спирали.

Пример 14. Основной принцип применения для мини-НА группы 2

Разработанные структуры

Структурные элементы, необходимые для получения тримерных полипептидов
 20 стеблевого домена по настоящему изобретению, экспрессировали в остове НА Н3 (A/Hong Kong/1/1968), а также переносили в два альтернативных остова Н3; т. е. A/Wisconsin/67/2005 и A/Singapore/INFIMH/16/0019/2016. Структурные элементы вводили постепенно; набор I полипептидов содержал минимальный набор мутаций, набор II дополнительно включал частичные мутации для стабилизации В-петли, а
 25 набор III включал все дополнительные мутации для стабилизации В-петли.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих и анализ надосадочной жидкости культуры

30 Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, содержащие С-концевой FLAG-линкер-His-метка для скрининга, продуцировали в микромасштабе в линии эукариотических клеток Expi293F (200 мкл) и неочищенную надосадочную жидкость клеточной культуры анализировали с помощью аналитической SEC в день сбора продукции, как описано в примере 3.

Результаты и вывод

Как было видно по результатам SEC-MALS-анализа, перенос структурных элементов набора I приводил к образованию тримерных полипептидов стеблевого домена для всех 3 остовов, однако пик тримеров был наиболее очевиден для полипептида, полученного от A/Wisconsin/67/2005, и наименее для полипептида, полученного от A/Hong Kong/1/1968 (фигура 14A). Дополнительные стабилизирующие мутации в В-петле (набор II и набор III) приводили к значимому увеличению уровней экспрессии полипептида и содержания тримеров (фигура 14B). В своей совокупности результаты подтверждали, что перенос модификаций полипептидов по настоящему изобретению на другие остовы группы 2 приводил к получению растворимого тримерного мини-НА.

Пример 15. *Управляемая аденовирусом экспрессия in vitro правильно свернутого тримерного мини-НА группы 2 на клеточной мембране клеток фибробластов легких человека.*

В данном примере оценивали управляемую аденовирусом 26 (Ad26.FLU.004) экспрессию и сворачивание тримерного UFV180480 (UFV18088 с нативным трансмембранным доменом) на клеточной поверхности фибробластов легких человека (MRC-5). Клетки MRC-5 трансдуцировали (5000 в.ч./клетки) в культуральной среде. Спустя два дня клетки либо лизировали в буфере для лизиса для оценки экспрессии тримерного UFV180480 с помощью вестерн-блоттинга, либо клетки собирали путем трипсинизации для оценки с помощью проточной цитрометрии экспрессии на клеточной поверхности правильно свернутого UFV180480. В обоих случаях в качестве отрицательного контроля был включен Ad26.Empty, у которого отсутствовал трансген, кодирующий UFV180480.

Белковые лизаты из клеток, трансдуцированных посредством Ad26.FLU.004, а также белок UFV180088, который служил положительным контролем, обрабатывали для проведения SDS-PAGE в восстанавливающих условиях (обеспечивающих полное разворачивание тримерных белков mini-НА группы 2) или в невосстанавливающих условиях (обеспечивающих сохранение тримерной природы белка мини-НА) и белки переносили на нитроцеллюлозный блот. Экспрессию тестировали путем зондирования блота биотинилированным антителом CR9114, специфичным к конформации мини-НА

группы 2, и визуализировали экспрессию с применением стрептавидина, конъюгированного с HRP.

Для тестирования связанной с клеточной мембраной экспрессии UFV180480 с помощью проточной цитрометрии клетки, трансдуцированные посредством Ad26.FLU.004, подвергали трипсинизации и ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии. Непермеабиллизированные клетки зондировали с помощью CR9114 и, после обширной промывки, с помощью конъюгированных с PE антител к антителам человека для визуализации UFV180480.

10 Результаты и вывод

С помощью анализа методом проточной цитрометрии анализировали экспрессию UFV180480 на клеточной поверхности. По сравнению с клетками, трансдуцированными посредством Ad26.Empty (фиг. 16A), большинство клеток MRC-5, трансдуцированных посредством Ad26.FLU.004 (~96,3%), демонстрировали высокие уровни UFV180480 на клеточной поверхности (фиг. 16B).

Анализ экспрессии UFV180480 в MRC-5 методом проточной цитометрии не позволял дифференцировать экспрессию мономерного или тримерного UFV180480. Поэтому проводили вестерн-блоттинг. На основе молекулярной массы и путем сравнения с тримерным UFV180088 было продемонстрировано, что Ad26.FLU.004 управляет экспрессией тримерного UFV180480 в клетках MRC-5 (фиг. 16C). На основе аминокислотной последовательности мономерного UFV180480 молекулярная масса была оценена в 34,4 кДа, что давало размер тримерного UFV180480 около 103,2 кДа. Лизат из клеток, трансдуцированных посредством Ad26.FLU.004 (5000 в.ч./клетка), но не из клеток, трансдуцированных посредством Ad26.Empty, обеспечивал получение полосы около 103,2 кДа и был немного выше по сравнению с тримерным UFV180088 (ожидаемая MW 89,1 кДа) (см. фиг. 16C, дорожки 1-3). Не наблюдали никаких полос на уровне около 34 кДа, что указывало на то, что основная часть UFV180480 была представлена в его тримерной форме (фиг. 16C, дорожка 1). Ни в одном из образцов не наблюдали специфической полосы при обработке в восстанавливающих (т. е. приводящих к полному разворачиванию) условиях (фиг. 16C, дорожки 4-6).

Таким образом, согласно настоящему изобретению было подтверждено, что UFV180480 экспрессируется *in vitro* при трансдукции Ad26.FLU.004. Также наличие тримерного белка было подтверждено на поверхности клеток человека.

Пример 16. Полипептиды UFV170278 и UFV170282 по настоящему изобретению являются иммуногенными и индуцируют защиту на интактной мышинной модели смертельного заражения H3N2 A/Hong Kong/1/1968

5 В данном примере сравнивали иммуногенность и защитную эффективность *in vivo* (на основе доли выживших в конце периода наблюдения) диапазона доз 2% (об./об.) UFV170278 (с консервативным мотивом для N-связанного гликана в положении 38) и UFV170282 (без консервативного мотива для N-связанного гликана в положении 38) с добавлением Adjuplex в качестве адъюванта по сравнению с
10 животными, иммунизированными холостой пробой (PBS).

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) три раза с трехнедельным интервалом внутримышечно иммунизировали диапазоном доз растворимого тримерного UFV170278 или UFV170282 с добавлением 2% (об./об.) Adjuplex в качестве адъюванта. Диапазон доз состоял из 4 10-кратных разведений,
15 начиная с 30 мкг и до 0,03 мкг. В качестве отрицательного контроля 18 мышей трижды иммунизировали посредством PBS. Через четыре недели после последней иммунизации у мышей брали кровь для анализа иммунного ответа и спустя один день мышей подвергали контрольному заражению 12,5 x LD₅₀ адаптированного к мышам вируса для контрольного заражения H3N2 A/Hong Kong/1/1968 и отслеживали (выживаемость,
20 масса, клинические показатели) в течение 3 недель. Доля выживших в конце периода последующего наблюдения служила параметром первичного исхода.

Результаты

Было продемонстрировано, что UFV170278 и UFV170282 были
25 иммуногенными, поскольку все дозы UFV170278 и UFV170282 индуцировали значимо более высокие титры антител, специфичных к стеблевому домену HA H3 A/Hong Kong/1/1968 (измеренные с помощью конкурентного анализа с CR9114), по сравнению с титрами в группе, получавшей PBS (P<0,001; ANOVA с апостериорным t-критерием, ступенчатым тестированием (начиная с наиболее высокой дозы) и 2-кратной поправкой
30 Бонферрони по конструкциям), см. фиг. 17А.

Кроме того, UFV170278 и UFV170282 с добавлением Adjuplex в качестве адъюванта обеспечивали значимую защиту (P<0,001; точный критерий Фишера, ступенчатое тестирование (начиная с наиболее высокой дозы) и 2-кратная поправка Бонферрони по конструкциям) при всех дозах по сравнению с группой, получавшей

PBS, см. фиг. 17B. Потеря массы тела (определяемая по площади под кривой) была значимо снижена ($P < 0,001$; ANOVA, 2-кратная поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) при всех дозах по сравнению с группой, получавшей PBS, см. фиг. 17B.

5

Выводы

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что UFV170278 и UFV170282 являются иммуногенными и обеспечивают защиту в мышинной модели смертельного контрольного заражения H3N2 A/Hong Kong/1/1968.

10

Пример 17. *Полипептиды UFV180088, UFV180089 и UFV180090 по настоящему изобретению являются иммуногенными в интактной мышинной модели контрольного заражения*

15

В данном примере сравнивали иммуногенность *in vivo* диапазона доз 2% (об./об.) UFV180088, UFV180089 и UFV180090 с добавлением Adjuplex в качестве адъюванта по сравнению с животными, иммунизированными холостой пробой (PBS).

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) один, два или три
20 раза с 3-недельным интервалом внутримышечно иммунизировали посредством 3 мкг растворимого тримерного UFV180088, UFV180089 или UFV180090. Окончательные иммунизации проводили в один и тот же день. В качестве отрицательного контроля 18 мышей трижды иммунизировали посредством PBS. Во все иммунизации добавляли 2% (об./об.) Adjuplex в качестве адъюванта. Через четыре недели после последней
25 иммунизации у мышей брали кровь для анализа иммунного ответа.

Результаты

Было показано, что UFV180088, UFV180089 и UFV180090 были иммуногенными, так как все конструкции индуцировали значимо более высокие титры
30 антител, специфичных к стеблевому домену HA H3 A/Hong Kong/1/1968 (измеренные с помощью конкурентного анализа с CR9114), после двух или трех иммунизаций по сравнению с титрами в группе, получавшей PBS ($P < 0,001$; Wilcoxon, 3-кратная поправка Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы), см. фиг. 18A. Ни одна конструкция не

индуцировала значимую выработку антител, специфичных к стеблевому домену, после одной иммунизации.

Все конструкции индуцировали значимо более высокие титры антител, специфичных к НА Н3 А/Hong Kong/1/1968 и Н3 А/Texas/50/2012 (измеренные с помощью ELISA связывания НА FL), после двух или трех иммунизаций по сравнению с титрами в группе, получавшей PBS ($P<0,01$; Wilcoxon, 3-кратная поправка Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы), см. фиг. 18B. Кроме того, одна иммунизация посредством UFV180088 и UFV180089 индуцировала значимо более высокие титры антител, специфичных к НА Н3 А/Texas/50/2012, по сравнению с титрами у группы, получавшей PBS ($P<0,01$).

Все конструкции индуцировали значимо более высокие титры антител, специфичных к НА Н7 А/Netherlands/219/2003 (измеренные с помощью анализа связывания НА FL), после трех иммунизаций по сравнению с титрами в группе, получавшей PBS ($P<0,001$; Wilcoxon, 3-кратная поправка Бонферрони для множественных сравнений и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы), см. фиг. 18B. Две иммунизации посредством UFV180089 и UFV180090 индуцировали значимо более высокие титры по сравнению с титрами антител в группе, получавшей PBS ($P<0,001$ и $P<0,01$ соответственно), тогда как после однократной иммунизации значимо более высокие титры не детектировались.

Выводы

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением было показано, что UFV180088, UFV180089 и UFV180090 были иммуногенными в интактной мышинной модели. Все конструкции индуцировали выработку значительных титров антител, специфичных к стеблевому домену НА, и антител, связывающих множество филогенетически различных белков НА Н3 (из штаммов, выделенных в разные годы) и Н7.

Пример 18. *Полипептиды UFV180088, UFV180089 и UFV180090 по настоящему изобретению индуцируют защиту от смертельного заражения посредством H3N2 A/Hong Kong/1/1968 на интактной мышинной модели контрольного заражения*

В данном примере сравнивали защитную эффективность *in vivo* (на основе доли выживших в конце периода наблюдения) диапазона доз 2% (об./об.) UFV180088, UFV180089 и UFV180090 с добавлением Adjuplex в качестве адъюванта по сравнению с животными, иммунизированными холостой пробой (PBS).

Группы из 10 самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель) один, два или три раза с 3-недельным интервалом внутримышечно иммунизировали посредством 3 мкг растворимого тримерного UFV180088, UFV180089 или UFV180090. Окончательные иммунизации проводили в один и тот же день. В качестве отрицательного контроля 18 мышей трижды иммунизировали посредством PBS. Во все иммунизации добавляли 2% (об./об.) Adjuplex в качестве адъюванта. Через четыре недели после последней иммунизации мышей подвергали контрольному заражению 25 x LD₅₀ адаптированного к мышам вируса для контрольного заражения H3N2 A/Hong Kong/1/1968 и отслеживали (выживаемость, масса, клинические показатели) в течение 3 недель. Доля выживших в конце периода последующего наблюдения служила параметром первичного исхода.

Результаты

Было показано, что UFV180088, UFV180089 и UFV180090 обеспечивали значимую защиту ($P < 0,001$; точный критерий Фишера, 2-кратная поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) в случаях двух или трех иммунизаций, по сравнению с группой, получавшей PBS, см. фиг. 19. Ни одна конструкция не индуцировала значимую защиту после одной иммунизации. Потеря массы тела (определяемая по площади под кривой) была значимо снижена ($P < 0,05$; ANOVA, 2-кратная поправка Бонферрони по конструкциям и ступенчатое тестирование, начиная с наиболее высокой дозы) при всех дозах по сравнению с группой, получавшей PBS, за исключением одной иммунизации посредством UFV180089, см. фиг. 19.

Выводы

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением было показано, что UFV180088, UFV180089 и UFV180090 обеспечивали защиту в мышинной модели смертельного контрольного заражения H3N2 A/Hong Kong/1/1968.

5

Таблица 7. Стандартные аминокислоты, сокращения и свойства

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

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Belongia et al. (2016), *Lancet Infect. Dis.* 16: 942-951.
- Bommakanti et al. (2010), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(31): 13701-13706.
- 5 Bommakanti et al. (2012), *J Virol* 86: 13434.
- Ciani et al. (2010), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(46):19850-19855.
- Corbett et al. (2019), *mBio* 10(1): e2810-2818.
- Ekiert et al. (2009), *Science* 324(5924):246-51.
- Das et al. (1985), *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32: 217-236.
- 10 Garten et al. (2017), *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 67: 634-642.
- Gill et al. (2001), *Gene Therapy* 8: 1539-1546.
- Kaufmann (2000), *Mol Biotechnol* 16: 151-160.
- Letarov et al. (1993), *Biochemistry Moscow* 64: 817-823.
- Lorieau et al. (2010), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 11341.
- 15 S-Guthe et al. (2004), *J. Mol. Biol.* 337: 905-915.
- Steel et al. (2010), *mBio* 1(1): 1-9.
- Throsby et al. (2008), *PLOS One* 12(3): 1-15.
- Winter et al. (1981) *Nature* 292: 72-75.
- Wu et al. (2015) *Nature Communications* 6(7708):1-11.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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

5 QDLPGNDNST ATLCLGHHAV PNGTLVKTIT DDQIEVTNAT ELVQSSSTGK 50
ICNNPHRILD GIDCTLIDAL LGDPHCDVFQ NETWDLFVER SKAFSNCYPY 100
DVPDYASLRS LVASSGTLEF ITEGFTWTGV TQNGGSNACK RGP GSGFFSR 150
10 LNWLT KSGST YPVLNVTMPN NDNFDKLYIW GIHPSTNQE QTSLYVQASG 200
RVTVSTRRSQ QTIIPNIGSR PWVRGLSSRI SIYWTIVKPG DVLVINSNGN 250
LIAPRGYFKM RTGKSSIMRS DAPIDTCISE CITPN GSIPN DKPFQNVNKI 300
TYGACPKYVK QNTLKLATGM RNVPEKQTRG LFGAIAGFIE NGWEGMIDGW 350
YGFRHQNSEG TGQAADLKST QAAIDQINGK LNRVIEKTNE KFHQIEKEFS 400
15 EVEGRIQDLE KYVEDTKIDL WSYNAELLVA LENQHTIDLT DSEMKNLF EK 450
TRRQLRENAE EMGN GCFKIY HKCDNACIES IRNGTYDHDV YRDEALNNRF 500
QIKGVELKSG YKDWILWISF AISCFLLCVV LLGFIMWACQ RGNIRCNICI 550

20 SEQ ID NO: 1: H3, полноразмерный (A/Hong Kong/1/68)
MKTIIALS YIFCLALGQDLP GNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSTGKIC
NNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRS LVASSGTLEF
ITEGFTWTGV TQNGGSNACKRGP GSGFFSR LNWLT KSGSTYPVLNVTMPNNDNF DKLYIWGVHHPSTN
QEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQTIIPNIWSRPWVRGLSSRSIYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRG
25 YFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISECITPN GSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVP
EKQTRGLF GAIAGFIENGWEGMIDGWYGF RHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGK LNRVIEKTNEKF
HQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT DSEMKNLF EKTRRQLRENAE
DMGN GCFKIYHKCDNACIESIRNGNYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLC
VVLLGFIMWACQ RGNIRCNICI

30 БЕЛОК VH CR6261 (SEQ ID NO: 3)
EVQLVESGA EVKKPGSSVKVSKASGGPFRSYAISWVRQAPGQGPEWMGGIIPIFGTTKYAPKFQGRV
TITADDFAGTVYME LSSLRSED TAMY YCAKHMGYQVRETMDVWGKGT TVTVSS

35 БЕЛОК VL CR6261 (SEQ ID NO: 4)
QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNDYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKS
GTSATLGITGLQTGDEANYCATWDRRPTAYVVF GGGTKLTVL

40 БЕЛОК VH CR8020 (SEQ ID NO: 5)
QVQLQQSGAEVKTPGASVKVSKASGYTFTSFGVSWIRQAPGQGLEWIGWISAYNGDTYYAQKFQARV
TMTTDTSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDNWGQGT LVTVSS

45 БЕЛОК VL CR8020 (SEQ ID NO: 6)
EIVLTQSPGTL SLPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRISGSGS
GTDFTLTISRLEPADFAVYYCQQYGTSPRTFGQGAKEIK

БЕЛОК VH CR9114 (SEQ ID NO: 7)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKSSGGTSNNY AISWVRQAPGQGLDWMGGISPIFGSTAYAQKFQGRV
TISADIFSN TAYMELNSLTSED TAVYFCARHGNY YYYSGMDVWGQGT TVTVSS

50 БЕЛОК VL CR9114 (SEQ ID NO: 8)

SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVNWYQQFPGTAPKLLIYSNDQRPSVVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLQSEDEAEYYCAAWDDSLKGAVFGGGTQLTVL

FL HA OF Wisconsin/67/2005 (SEQ ID NO: 13)

5 MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGGIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
NDESFNWTGVTQNGTSSSSCKRRSNNSFFSRLNWLTHLKFYKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPVTD
NDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRIRNIPSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
10 YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVP
EKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGIGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKF
HQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFERTKKQLRENAE
DMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLC
VALLGFIMWACQKGNIRCNICI

15 FL HA OF A/Singapore/INFMH/16/0019/2016 (SEQ ID NO: 14)

MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNNDSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
KNESFNWTGVTQNGTSSACIRGSSSSFFSRLNWLTHLNYKYKYPALNVTMPNNEKFQDKLYIWGVHHPGTD
KDQIFPYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGSRPRIRGIPSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
20 YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKHSTLKLATGMRNVP
EKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKF
HQIEKEFSEVEGRVQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTKKQLRENAE
DMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNETYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLC
VALLGFIMWACQKGNIRCNICI

25 FL HA OF A/Perth/16/2009 (SEQ ID NO: 15)

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGEIC
DSPHQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
NNESFNWTGVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTHLNFYKYPALNVTMPNNEKFQDKLYIWGVLHPGTD
30 KDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVSPNIGSRPRVRNIPSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVP
EKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKF
HQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTKKQLRENAE
DMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLC
35 VALLGFIMWACQKGNIRCNICI

FL HA OF A/Brisbane/10/2007 (SEQ ID NO: 16)

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNNDSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
40 NNESFNWTGVTQNGTSSACIRRSNNSFFSRLNWLTHLKFYKYPALNVTMPNNEKFQDKLYIWGVHHPGTD
NDQIFPYAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRVRNIPSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVP
EKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGIGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKF
HQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTKKQLRENAE
45 DMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLC
VALLGFIMWACQKGNIRCNICI

FL HA OF A/Panama/2007/1999 (SEQ ID NO: 17)

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKKEWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
50 NNESFNWTGVAQNGTSSACKRRSNKSFFSRLNWLHQLKYKYPALNVTMPNNEKFQDKLYIWGVHHPSTD
SDQISIIYAQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSSPWWRGVSSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVP
EKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNEKF
55 HQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFERTKKQLRENAE

DMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLC
VVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

BEJOK VH CT149 (SEQ ID NO: 37)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYSFSTYGVSWVRQAPGQGPEWVGWISAYTGITDYAQKFQGRV
TLTTDATTTATAFLDLRLRPDDTATYFCARDKVQGRVEVGSGRHDYWGQGTLLVIVSS

BEJOK VL CT149 (SEQ ID NO: 38)

10 EVVLTQSPGTLALPPGERATLSCRASHRVGSTYIAWYQQKSGQAPRRLIYGASNRATDIPDRFSGSGS
GTDFTLTIRLEPEDSAVYYCQQFSVSPWTFGQGRVEIK

SD15013 (SEQ ID NO: 39)

15 EVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTLSTIYSMGWFRQAPGKEREFEVATIGWNSGRTFYPDSLKGRF
TISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSSAAAWSHPPQFEKGAA
WSHPQFEKGAAWSHPPQFEK

SEQ ID NO 40: UFV180088

20 MKTIIALSIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVEPEA

SEQ ID NO 41: UFV180089

25 MKTIIALSIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDDDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVEPEA

SEQ ID NO 42: UFV180090

30 MKTIIALSIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITGI
LNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVEPEA

SEQ ID NO 43: UFV180141

35 MKTIIALSIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
40 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 44: UFV180192

45 MKTIIALSIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 45: UFV180193

50 MKTIIALSIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 46: UFV180194

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
 VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRIQC LEKYVEDTKIDLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 47: UFV180195

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
 VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWSYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 48: UFV180196

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGI
 LNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 49: UFV180197

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
 VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 50: UFV180198

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
 VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 51: UFV180199

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
 VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 52: UFV180200

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
 VNRVIEKTNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
 PGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 53: UFV180201

MKTIIALS YIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIT EDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
 VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSEVEGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF

EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 54: UFV180202

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQIEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

10

SEQ ID NO 55: UFV180203

15 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQHTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 56: UFV180204

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDLTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

25 SEQ ID NO 57: UFV180205

30 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 58: UFV180206

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 59: UFV180207

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

45

SEQ ID NO 60: UFV181034

50 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQIEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 61: UFV181036

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI

VNRVIEKMNEKFHQIEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDLTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 62: UFV181038

5 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKFHQIEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

10 SEQ ID NO 63: UFV181040

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

15 SEQ ID NO 64: UFV181042

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQHTIDLTDSEMKNLF
20 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 65: UFV161333

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
25 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 66: UFV161739

30 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

35 SEQ ID NO 67: UFV161800

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
40 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIINGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 68: UFV161804

45 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRFQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIINGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

50 SEQ ID NO 69: UFV170991

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMKNLF

EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 70: UFV171004

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

10

SEQ ID NO 71: UFV171190

15 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNF
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALFNQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 72: UFV171191

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALMNQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

25 SEQ ID NO 73: UFV171192

30 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNF
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 74: UFV171193

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNV
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALLNQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 75: UFV171194

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNM
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

45

SEQ ID NO 76: UFV171195

50 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNT
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 77: UFV170611

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQHTIDYTDSEMN
5 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 78: UFV170612

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
10 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQKTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 79: UFV170613

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
15 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
20 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 80: UFV170614

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
25 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQQTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 81: UFV161908

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
30 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 82: UFV171197

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
35 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMNKLF
40 EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 83: UFV180666

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
45 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKTNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 84: UFV180667

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
50 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKVNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMNKLF

EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 85: UFV180668

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKINEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
10 PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 86: UFV180669

15 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKLNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 87: UFV180670

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKFNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 88: UFV180671

25 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKYNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
30 PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 89: UFV180672

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKWNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 90: UFV180673

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKHNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
45 PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 91: UFV180674

50 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKKNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 92: UFV180675

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKRNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
5 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 93: UFV170636

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSSKYVCQNT
10 LKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNKV
NRVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKNLFE
KTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIAA
ADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 94: UFV170637

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSSKYVCQN
15 TLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
20 AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 95: UFV170638

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSSKYVCQ
25 NTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITN
KVNVRVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKNL
FEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI
AAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 96: UFV170639

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSSSTKYVC
30 QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
NKVNVRVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKN
LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 97: UFV170640

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSSSTGKYV
35 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNVRVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEM
NKLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
40 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 98: UFV160653

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGPGSKYV
45 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEM
NKLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 99: UFV160764

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSPKYVCQN
50 TLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNSVIEKMNEKSHQTEKESNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKNLF

EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 100: UFV160765

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSCPKYVCQ
NTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITN
KVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKNL
FEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI
10 AAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 101: UFV160766

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSACPKYVC
QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
15 NKVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKN
LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 102: UFV160674

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGAGPKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 103: UFV160675

25 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGACPKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
30 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 104: UFV160767

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSACPKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 105: UFV160768

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSCPKYVC
QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
NKVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMKN
LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
45 IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 106: UFV160769

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSACPKY
VCQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQ
ITNKVNVSIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEM
50 NKLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK
DWIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 107: UFV160770

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSCPKEYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
5 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 108: UFV160771

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSPKYVCQ
10 NTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITN
KVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMNKL
FEKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI
AAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 109: UFV160772

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSPKYVC
15 QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
NKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMNK
LFEKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
20 IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 110: UFV160321

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGGGGKYV
25 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 111: UFV160403

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSNPHRYV
30 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 112: UFV160404

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGDPHKYV
40 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 113: UFV160405

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSNGGSKYV
45 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 114: UFV160406

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGGSNKYV
50 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN

KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 115: UFV160407

5 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGSNAKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

10 SEQ ID NO 116: UFV160408

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
15 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 117: UFV160409

20 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGSGFKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

25 SEQ ID NO 118: UFV160410

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGSGKYVC
QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
NKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMNK
LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
30 IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 119: UFV160411

35 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGGKYVCQ
NTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITN
KVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMNKL
FEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI
AAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 120: UFV160412

40 MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGGSKYVC
QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
NKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMNK
LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

45 SEQ ID NO 121: UFV160413

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSGSKYVC
QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
NKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMNK
50 LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 122: UFV160414

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSH PSTKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 5 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 123: UFV160415

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSI PNKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 10 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 124: UFV160416

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSG LSSKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 15 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 125: UFV160417

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSK PGDKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 20 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 25 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 126: UFV160418

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSD APIKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 30 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 127: UFV160419

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQST PKNKYVC
 QNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQIT
 35 NKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMNK
 LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
 40 IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 128: UFV160420

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQST PNGKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 45 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDLTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 129: UFV161686

MKTIIALSII FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSG PGSKYV
 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
 50 TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSEVEGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
 KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 130: UFV161722

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSQATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
5 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 131: UFV161723

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
10 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNAQGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 132: UFV161688

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
15 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIPKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
20 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 133: UFV161689

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
25 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEPMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 134: UFV161690

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
30 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKPNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
35 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 135: UFV161691

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
40 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMPEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 136: UFV161692

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
45 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNPESHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 137: UFV161693

MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
50 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEPSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
55 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 138: UFV161694

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKPHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 139: UFV161695

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSPQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 140: UFV161696

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 141: UFV161697

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQPEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 142: UFV161698

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTPKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 143: UFV161699

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEPESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 144: UFV161700

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKPSSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 145: UFV161701

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKEPSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN

KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 146: UFV161702

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESPNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

10

SEQ ID NO 147: UFV161703

15 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESPNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 148: UFV161704

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESNPTGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

25 SEQ ID NO 149: UFV161705

30 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESNAPGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 150: UFV161706

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESNATPRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 151: UFV161707

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESNATGPMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

45

SEQ ID NO 152: UFV161708

50 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKPHQTPKESNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 153: UFV161709

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKPHQTEKPSSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
5 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 154: UFV161715

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
10 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSNQTEKSSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 155: UFV161721

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
15 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKNSSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
20 IAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 156: UFV171187

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
25 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 157: UFV171120

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
30 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEK_hHTTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 158: UFV171121

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
35 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEK_hHTTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
40 EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 159: UFV170994

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
45 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSNQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 160: UFV170995

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
50 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF

EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIA
AADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 161: UFV180208

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKFHQTEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQHTIDLT DSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
10 PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 162: UFV180217

15 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKFHQTEKCPNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQHTIDLT DSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 163: UFV170278

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
25 WIGAAEPEA

SEQ ID NO 164: UFV170282

30 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIGAAEPEA

SEQ ID NO 165: UFV160595

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKSSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 166: UFV161196

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKGP
KCNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKSSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
45 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 167: UFV161198

50 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKCV
PQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKSSNATGRMKQIEDKIEEIECKLWAYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 168: UFV161169

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLCKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVNSVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALECQRTIDYTDSEMN
5 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 169: UFV170062

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
10 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 170: UFV170051

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
15 KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
20 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 171: UFV170428

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
25 TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 172: UFV170440

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNAIELVQSGPGSKYV
30 CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKSSNATGCMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFETRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
35 WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 173: UFV171272

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
40 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI

SEQ ID NO 174: UFV171273

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
45 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD

SEQ ID NO 175: UFV171274

MKTIIALSIIIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
50 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGY

SEQ ID NO 176: UFV171275

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
5 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKS

SEQ ID NO 177: UFV171276

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQITNK
10 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVEL

SEQ ID NO 178: UFV171277

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQITNK
15 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGV

SEQ ID NO 179: UFV171278

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQITNK
20 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIK

SEQ ID NO 180: UFV171279

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQITNK
25 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQ

SEQ ID NO 181: UFV171280

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQITNK
30 VNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQNTIDYTDSEMNKLF
35 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNR

SEQ ID NO 182: UFV161454

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQI
40 NGKLN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 183: UFV161453

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQI
45 NNKLN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 184: UFV161459

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEG TGQAADLKSTQAAIDQI
50 NAKLN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN

KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 185: UFV161451

5 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
NNKVN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

10

SEQ ID NO 186: UFV161458

15 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
NAKVN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 187: UFV161450

20 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKLN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

25 SEQ ID NO 188: UFV161448

30 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNAIELVQSGPGSKYV
CQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQI
TNKVN RVIEKMNEKSHQTEKESSNATGRMKQIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQRTIDYTDSEMN
KLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 189: UFV171116

35 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGI
LNRVIEKMNEKSHQTECESSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD
WIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 190: UFV172561

40 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

45

SEQ ID NO 191: UFV172563

50 MKTIIALSIFYFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMNKLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 192: UFV172564

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMKNLF
5 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDDDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 193: UFV172571

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVNTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
10 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 194: UFV172562

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
15 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITGI
LNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
20 PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 195: UFV172588

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
25 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITGI
LNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 196: UFV172583

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
30 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITGI
LNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDDDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 197: UFV172585

MKTIIALSIFYCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVNTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
35 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITGI
LNRVIEKMNEKSNQTECEPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQRTIDYTDSEMKNLF
40 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDDDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVAAADYKDDDDK
PGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 198: UFV180642

MKTIIALSIFYLCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSRYVCHS
45 TLKLATGMRNVPEKQTQGIFGAIAAGFIENGWEGMVDGWYGFRWQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQITNK
VNRLIGKMNEKFHQIEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
EKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNETYDHNVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 199: UFV180645

MKTIIALSIFYLCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSRYVCQN
50 TLKLATGMRNVPEKQTQGIFGAIAAGFIENGWEGMVDGWYGFRWQNSEGIGQAADLKSTQAAINQITNK
VNRLIGKMNEKFHQIEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
ERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 200: UFV180647

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKFHQIEKCFSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
5 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 201: UFV181106

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
10 VNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 202: UFV181107

MKTIIALSYIILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSRYVCQN
15 TLKLATGMRNVPEKQTQGIFGAIAAGFIENGWEGMVDGWYGFRWQNSEGIGQAADLKSTQAAINQITNI
VNRLIGKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
ERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 203: UFV181109

MKTIIALSYIILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSRYVCHS
20 TLKLATGMRNVPEKQTQGIFGAIAAGFIENGWEGMVDGWYGFRWQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRLIGKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNETYDHNVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 204: UFV181117

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSKYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
25 EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 205: UFV181118

MKTIIALSYIILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSRYVCQN
TLKLATGMRNVPEKQTQGIFGAIAAGFIENGWEGMVDGWYGFRWQNSEGIGQAADLKSTQAAINQITNI
VNRLIGKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
30 35 ERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 206: UFV181120

MKTIIALSYIILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSRYVCHS
40 TLKLATGMRNVPEKQTQGIFGAIAAGFIENGWEGMVDGWYGFRWQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRLIGKMNEKSHQTEKCSSNATGRMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNETYDHNVYRDEALNNRFQIKGVHHHHHH

SEQ ID NO 207: UFV180480 (UFV180088 + нативный трансмембранный (TM) домен)

MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQN
45 TLKLATGMRNVPEKQTQGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRWQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNI
VNRVIEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWIL
WISFAISCFLLCVLLGFIMWACQQRGNIRCNICI
50

SEQ ID NO 208: нуклеотидная последовательность, кодирующая UFV180088

ATGAAAACCATTTATCGCACTGAGTTACATCTTCTGCCTGGCTCTGGGACAGGATCTGCCTGG
GAACGACAACAGCACAGCAACACTGTGCCTGGGACACCATGCTGTGCCCAACGGGACCCCTGG

TCAAGACCATCACAGAGGATCAGGTGGAAGTGACTAATGCAACCGAACTGGTCCAGAGCTCC
 AAGTACGTGTGCCAGAACACCCCTGAAACTGGCCACAGGCATGAGAAATGTCCCTGAGAAGCA
 GACCCAGGGGCTGTTTCGGCGCTATCGCAGGCTTCATCGAGAACGGATGGGAAGGGATGATCG
 ACGGCTGGTATGGATTCCGGTGGCAGAATTCCGAGGGAACAGGGCAGGCCGCTGACCTGAAG
 5 TCTACTCAGGCAGCCATCGATCAGATTACCAACATCGTGAATCGCGTCATCGAGAAGATGAA
 CGAAAAAAGCAATCAGACAGAGAAGTGCCCTCCAATGCCACTGGCCCCATGAAGTGTATTG
 AGGATAAGATCGAGGAAATCGAAAGTAACTGTGGTGCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGGCT
 CTGATCAATCAGAATACAATCGACTATACTGATTTCAGAGATGAACAAGCTGTTTCGAAAAAAC
 TAGGAGACAGCTGCGAGAGAACGCAGAAGACATGGGCAATGGATGTTTTAAGATCTACCACA
 10 AATGCGATAACGCCTGTATCGAGTCTATTAGGAATGGCACATACGACCATGACGTGTACCGG
 GACGAAGCACTGAACAATCGCTTTCAGATCAAGGGGGTGGAAACCAGAGGCATAATAA

SEQ ID NO 209: нуклеотидная последовательность, кодирующая
 UFV180480 (UFV180088 + TM домен)

15 ATGAAGACCATCATCGCCCTGTCTTACATCTTCTGCCTGGCCCTGGGACAGGACCTGCCAGG
 CAACGATAATAGCACCGCCACCCTGTGCCTGGGACACCACGCAGTGCCCAACGGCACCCCTGG
 TGAAGACCATCACAGAGGACCAGGTGGAGGTGACCAATGCCACAGAGCTGGTGCAGAGCTCC
 AAGTACGTGTGCCAGAACACCCCTGAAGCTGGCCACAGGCATGAGAAATGTGCCCCGAGAAGCA
 GACCCAGGGCCTGTTTCGGAGCCATCGCCGGCTTTATCGAGAACGGCTGGGAGGGCATGATCG
 20 ATGGCTGGTATGGCTTTTCGGTGGCAGAATAGCGAGGGAACAGGACAGGCAGCAGACCTGAAG
 TCCACCCAGGCAGCCATCGATCAGATCACAAACATCGTGAATAGAGTGATCGAGAAGATGAA
 CGAGAAGTCCAATCAGACCGAGAAGTGCCCTCTAACGCCACAGGCCCTATGAAGTGTATCG
 AGGACAAGATCGAGGAGATCGAGTCCAAGCTGTGGTGCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGGCC
 CTGATCAACCAGAATACCATCGACTATACAGATTCTGAGATGAATAAGCTGTTTCGAGAAGAC
 25 CCGGAGACAGCTGAGGGAGAACGCCGAGGACATGGGCAATGGCTGTTTTAAGATCTACCACA
 AGTGCGATAACGCCTGTATCGAGAGCATCCGCAATGGCACATACGACCACGACGTGTACCGG
 GACGAGGCCCTGAACAATAGATTCCAGATCAAGGGCGTGGAGCTGAAGTCCGGCTATAAGGA
 TTGGATCCTGTGGATCTCTTTTCGCCATCAGCTGCTTTCTGCTGTGCGTGGTGCTGCTGGGCT
 TTATCATGTGGGCCTGTCAGAGGGGCAACATCCGCTGCAATATCTGTATCTGATAA

30 SEQ ID NO: 210 (минимальная последовательность UFV180088)

QDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKITITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQNTLKLATGMRN
 VPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFWRQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQITNIVNRV
 35 IEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKN
 LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGV

SEQ ID NO: 211 (минимальная последовательность UFV180089)

40 QDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKITITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQNTLKLATGMRN
 VPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFWRQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITNIVNRV
 IEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKN
 LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDDDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGV

45 SEQ ID NO: 212 (минимальная последовательность UFV180090)

QDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTKVKITITEDQVEVTNATELVQSSKYVCQNTLKLATGMRN
 VPEKQTQGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFWRQNSEGTGQAADYKSTQAAIDQITGILNRV
 IEKMNEKSNQTEKCPSNATGPMKCIEDKIEEIESKLWCYNAELLVALINQNTIDYTDSEMKN
 50 LFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNDCIASIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGV

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мономерный полипептид стеблевого домена гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А, содержащий домены НА1 и НА2 НА вируса гриппа А группы 2, при этом указанный полипептид стеблевого домена НА содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется следующим:

- делецией головной области из домена НА1;
- модификацией тримеризационной области в домене НА2;
- по меньшей мере двумя цистеиновыми остатками, способными образовывать по меньшей мере один внутримonomерный цистеиновый мостик;

и где в аминокислотной последовательности аминокислота в положении 355 представляет собой W,

где нумерация аминокислотных положений в аминокислотной

последовательности полипептида стеблевого домена НА соответствует нумерации H3, соответствующей нумерации в полноразмерном НА эталонного штамма A/Aichi/2/68 H3N2 (SEQ ID NO: 1).

2. Полипептид по п. 1, где аминокислота в положении 432 представляет собой I, или аминокислота в положении 432 представляет собой I и аминокислота в положении 380 представляет собой I.

3. Полипептид по п. 1 или п. 2, где аминокислота в положении 378 представляет собой T, аминокислота в положении 379 представляет собой N, и/или аминокислота в положении 381 представляет собой V.

4. Полипептид по п. 1, п. 2 или п. 3, дополнительно содержащий введенный мотив гликозилирования в положениях 401-403 для N-связанного гликозилирования в положении 401.

5. Полипептид по любому из пп. 1-4, где указанная делеция головной области в домене НА1 предусматривает делецию, охватывающую по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей

аминокислоте в положении 50, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 302, включительно.

- 5 6. Полипептид по п. 5, где делеция головной области в домене HA1 охватывает по меньшей мере аминокислотную последовательность от аминокислоты в положении 47 до аминокислоты в положении 306 включительно.
- 10 7. Полипептид по любому из пп. 1-6, где тримеризационная область в домене HA2 содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 405, до аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 419, включительно.
- 15 8. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где модификация тримеризационной области включает введение гетерологичного тримеризационного домена.
- 20 9. Полипептид по п. 8, где гетерологичный тримеризационный домен представляет собой последовательность GCN4.
- 25 10. Полипептид по любому из пп. 1-8, где модификация тримеризационной области включает замену последовательности гептадного повтора в С-спирали.
11. Полипептид по любому из предыдущих пп. 1-9, где модифицированная тримеризационная область в домене HA2 содержит аминокислотную последовательность ${}_{405}\text{RMKQIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 9) или ${}_{405}\text{PMKQIEDKIEEIESK}_{419}$ (SEQ ID NO: 10).
- 30 12. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, содержащий цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422; или цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 311, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422; или цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 308, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 418, где указанные

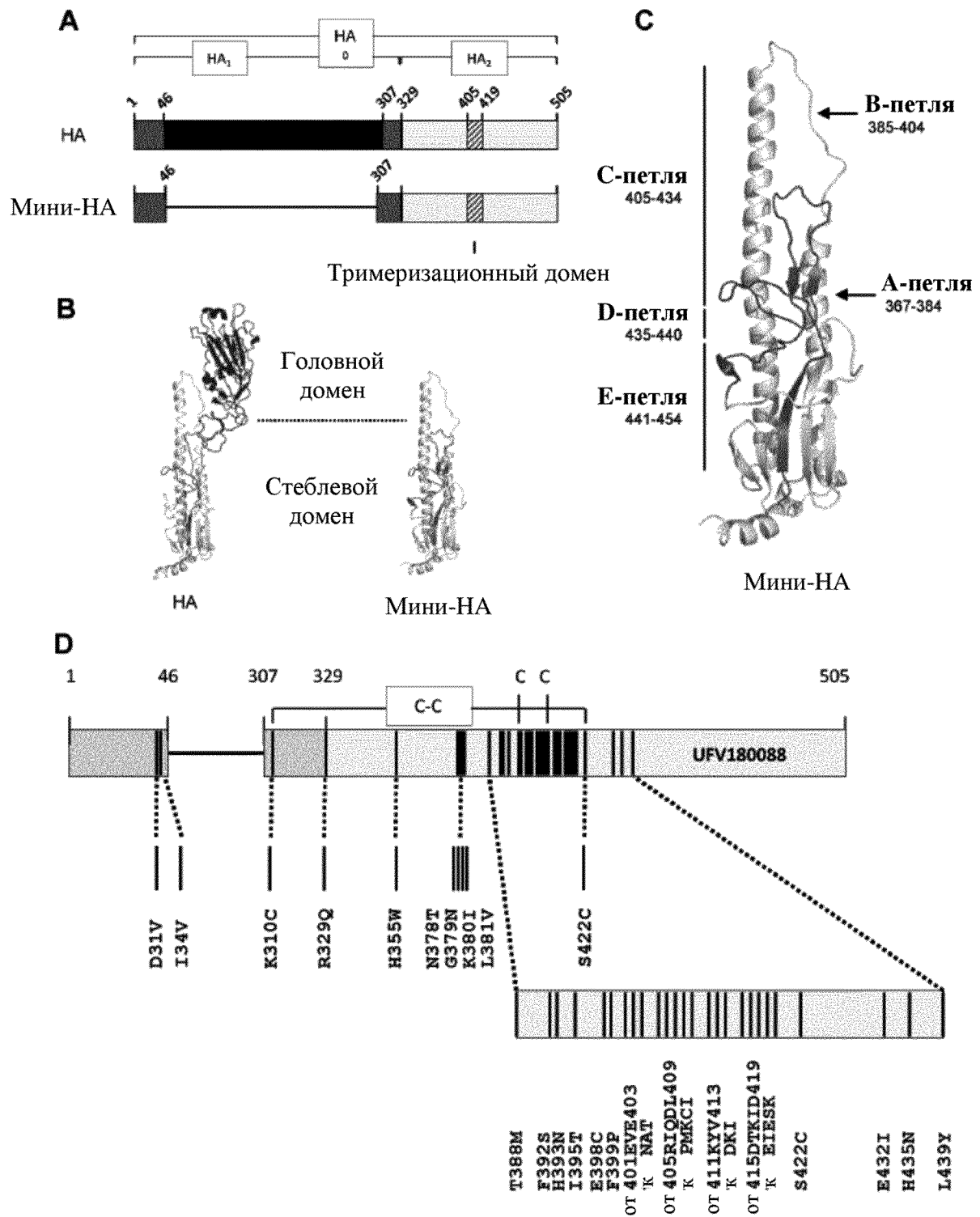
цистеиновые остатки способны образовывать внутримonomерный цистеиновый мостик.

- 5 13. Полипептид по п. 12, содержащий цистеин в аминокислотном положении, соответствующем положению 310, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 422, где указанные цистеиновые остатки образуют указанный по меньшей мере один внутримonomерный цистеиновый мостик.
- 10 14. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где аминокислота в положении 388 представляет собой М.
- 15 15. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, содержащий по меньшей мере один дополнительный введенный мотив гликозилирования.
- 20 16. Полипептид по п. 15, где по меньшей мере один дополнительный введенный мотив гликозилирования присутствует в положениях 392-394 для N-связанного гликозилирования в положении 392 и/или в положениях 393-395 для N-связанного гликозилирования в положении 393.
- 25 17. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где одна или несколько аминокислот в В-петле подвергнуты мутации по типу замены на Р.
- 30 18. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где:
 - аминокислота в положении 31 представляет собой Е, а аминокислота в положении 34 представляет собой V;
 - аминокислота в положении 392 представляет собой S или Р;
 - аминокислота в положении 395 представляет собой Т или Р;
 - аминокислота в положении 399 представляет собой S или Р;
 - аминокислота в положении 435 представляет собой N или R; и/или
 - аминокислота в положении 439 представляет собой Y.
- 35 19. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где monomer полипептида стеблевого домена НА не содержит участок расщепления протеазой между доменами НА1 и НА2.

20. Полипептид по п. 19, где аминокислота в положении 329 не является аргинином (R), где предпочтительно аминокислота в положении 329 представляет собой глутамин (Q).
- 5 21. Полипептид по любому из предыдущих пп. 1-18, где мономер полипептида стеблевого домена НА содержит природный участок расщепления или многоосновный участок расщепления.
- 10 22. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где домены НА1 и НА2 получены из вируса гриппа, содержащего НА подтипа Н3, предпочтительно из вируса гриппа A/Hong Kong/1/68.
- 15 23. Полипептид по п. 22, где одна или несколько аминокислот в указанных доменах НА и НА2 Н3 подвергнуты мутации по типу замены на соответствующие аминокислоты НА Н7.
- 20 24. Полипептид по п. 23, где
аминокислота в положении 25 представляет собой К;
аминокислота в положении 367 представляет собой Y;
аминокислота в положении 378 представляет собой Т;
аминокислота в положении 475 представляет собой D;
аминокислота в положении 476 представляет собой D; и/или
аминокислота в положении 479 представляет собой А.
- 25 25. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный полипептид стеблевого домена НА содержит сигнальную последовательность (ее часть).
- 30 26. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, содержащий усеченный домен НА2.
27. Полипептид по п. 26, где была подвергнута делеции по меньшей мере С-концевая часть домена НА2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 516.

28. Полипептид по п. 26 или п. 27, где была подвергнута делеции С-концевая часть домена НА2, начинающаяся с аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 506.
- 5 29. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где подвергнутая делеции головная область в домене НА1 была заменена линкерной последовательностью из 1-10 аминокислот.
- 10 30. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, содержащий цистеин в положении, соответствующем положению 396, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408, или цистеин в положении, соответствующем положению 397, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408; или цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408, или цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 405.
- 15 31. Полипептид по п. 30, содержащий цистеин в положении, соответствующем положению 398, в комбинации с цистеином в положении, соответствующем положению 408.
- 20 32. Мультимерный полипептид стеблевого домена гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А, содержащий по меньшей мере два мономера полипептида стеблевого домена НА по любому из предыдущих пунктов.
- 25 33. Мультимерный полипептид стеблевого домена гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А, содержащий по меньшей мере два мономера полипептида стеблевого домена НА по п. 30 или п. 31, где первый мономер полипептида стеблевого домена НА связан со вторым мономером межмономерным дисульфидным мостиком между цистеином в положении 396, 397 или 398 указанного первого мономера и цистеином в положении 408 второго мономера, или где первый мономер полипептида стеблевого домена НА связан со вторым мономером межмономерным дисульфидным мостиком между цистеином в положении 398 указанного первого мономера и цистеином в положении 405 второго мономера.
- 30

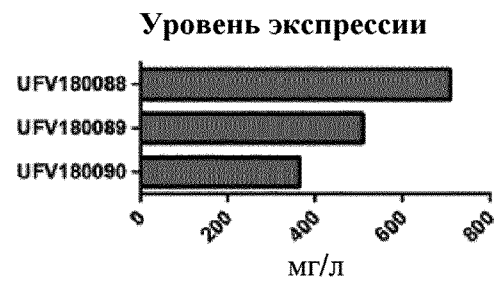
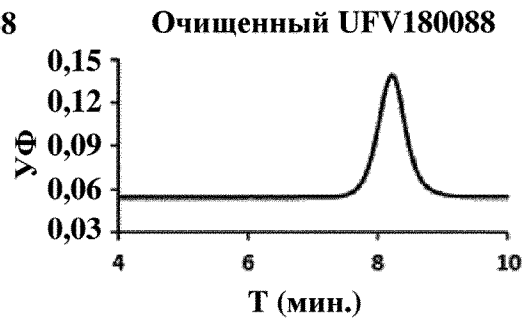
34. Мультимерный полипептид стеблевого домена гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А по п. 33, где первый мономер полипептида стеблевого домена НА связан со вторым мономером межмономерным дисульфидным мостиком между цистеином в положении 398 указанного первого мономера и цистеином в положении 408 второго мономера.
35. Мультимерный полипептид по любому из пп. 30-34, где полипептид является тримерным.
36. Нуклеиновая кислота, кодирующая мономер полипептида стеблевого домена НА по любому из предыдущих пп. 1-31.
37. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 36.
38. Вектор по п. 37, где вектор представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор.
39. Фармацевтическая композиция, содержащая мономерный полипептид стеблевого домена НА по любому из пп. 1-31, мультимерный полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 32-35, нуклеиновую кислоту по п. 36 и/или вектор по п. 37 или п. 38 и фармацевтически приемлемый носитель.
40. Мономерный полипептид стеблевого домена НА по любому из пп. 1-31, мультимерный полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 32-35, нуклеиновая кислота по п. 36 и/или вектор по п. 37 или п. 38 для применения в индуцировании иммунного ответа против вируса гриппа.
41. Мономерный полипептид стеблевого домена НА по любому из пп. 1-31, мультимерный полипептид стеблевого домена НА вируса гриппа по любому из пп. 32-35, нуклеиновая кислота по п. 36 и/или вектор по п. 37 или п. 38 для применения в качестве вакцины.



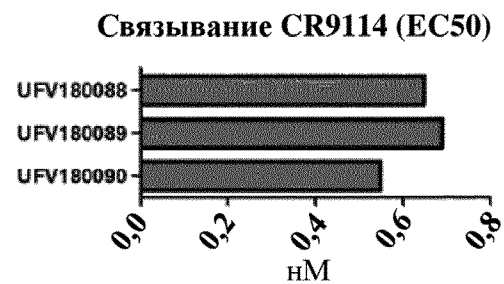
ФИГ. 1

A

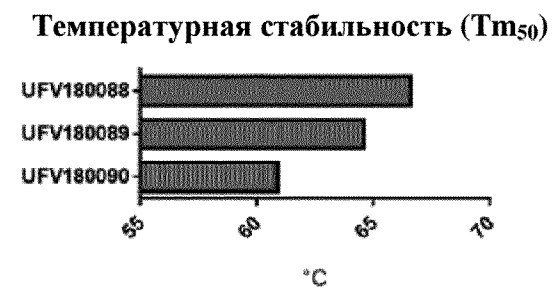
AA	25	367	379	381	475	476	479
WT	L	L	G	L	N	A	E
	L	L	N	V	N	A	E
	L	Y	N	V	D	D	A
	K	Y	G	L	N	D	A

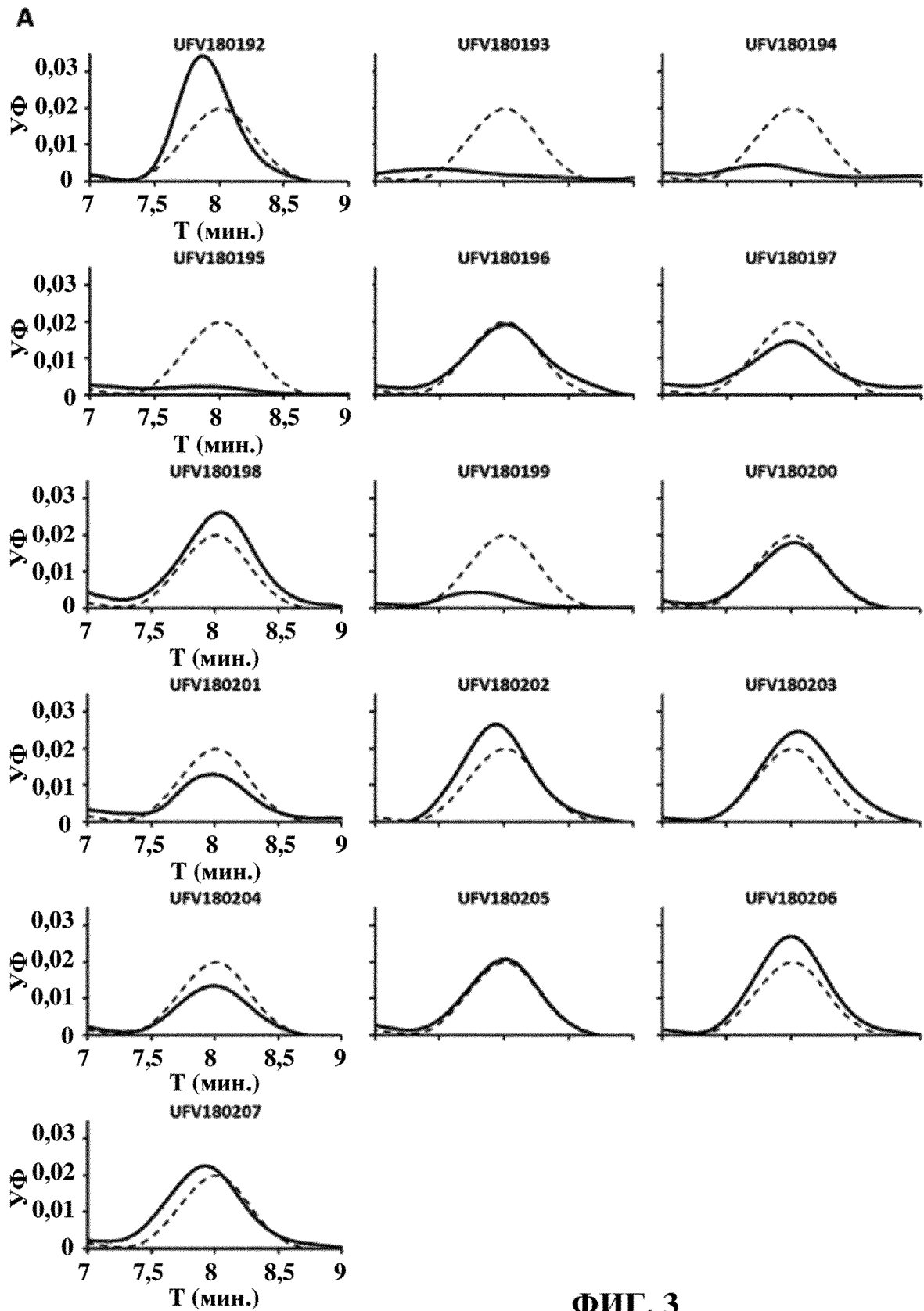
**B****C**

AA	25	367	379	381	475	476	479
WT	L	L	G	L	N	A	E
	L	L	N	V	N	A	E
	L	Y	N	V	D	D	A
	K	Y	G	L	N	D	A

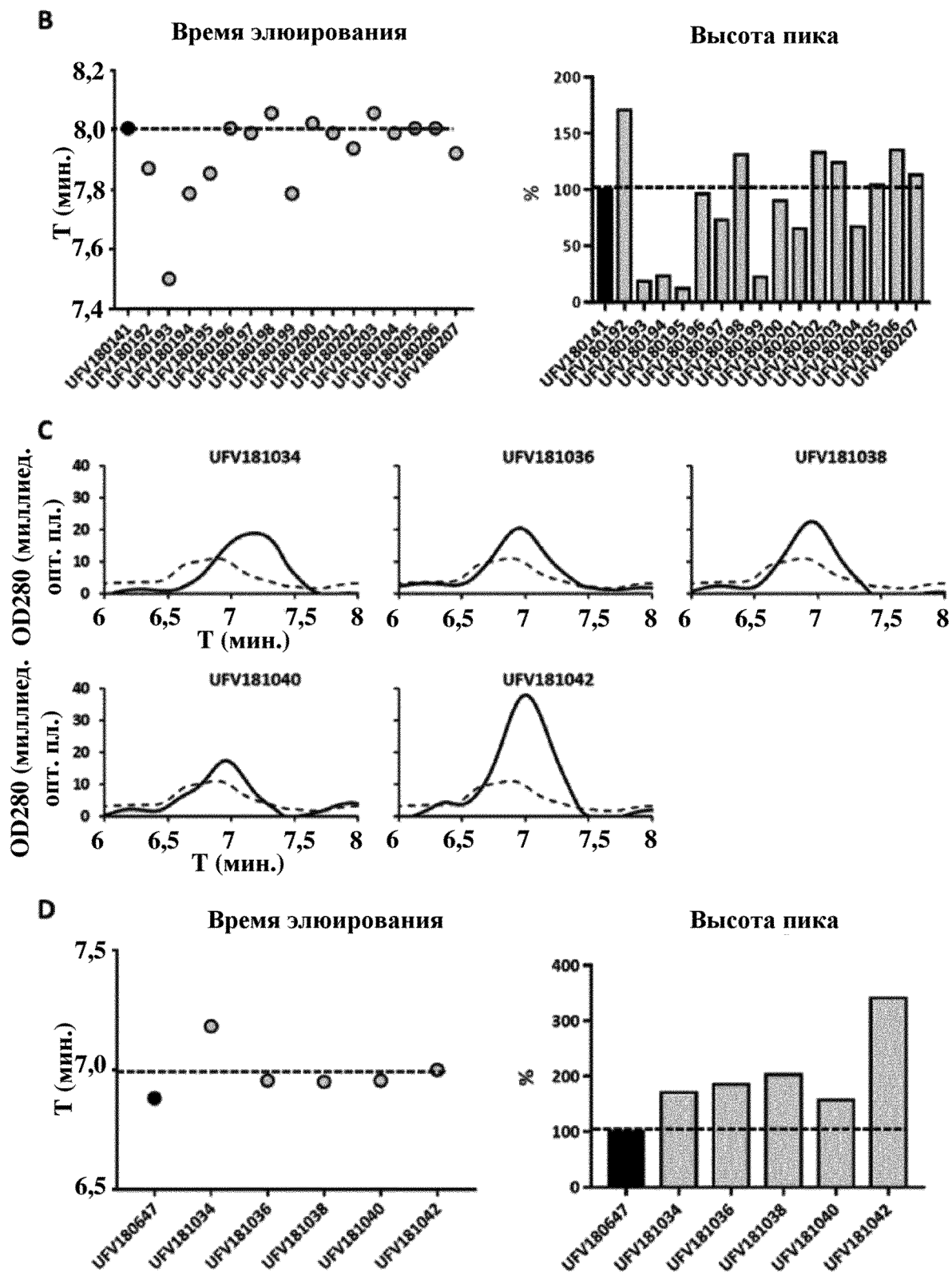
**D**

AA	25	367	379	381	475	476	479
WT	L	L	G	L	N	A	E
	L	L	N	V	N	A	E
	L	Y	N	V	D	D	A
	K	Y	G	L	N	D	A

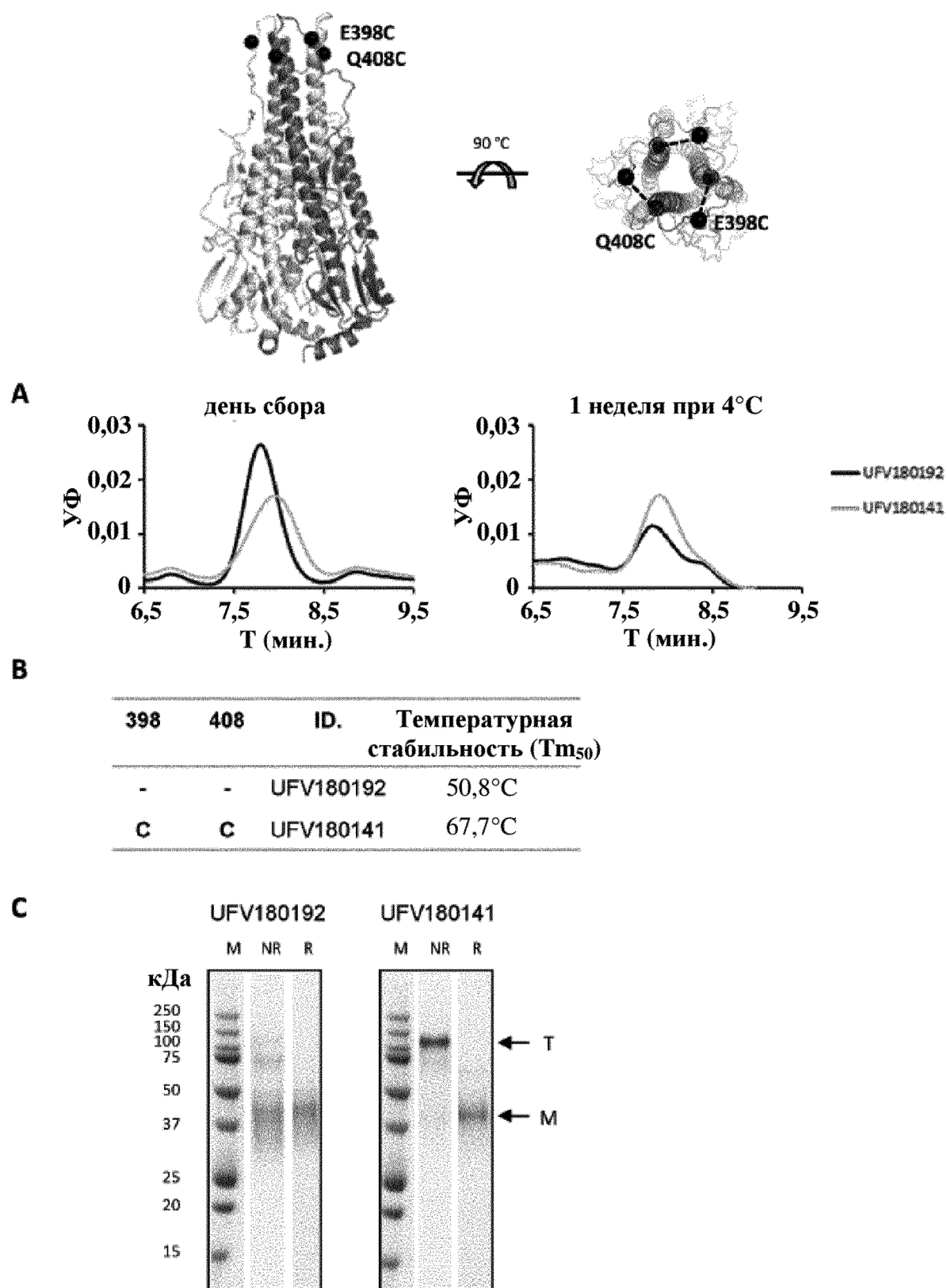
**ФИГ. 2**



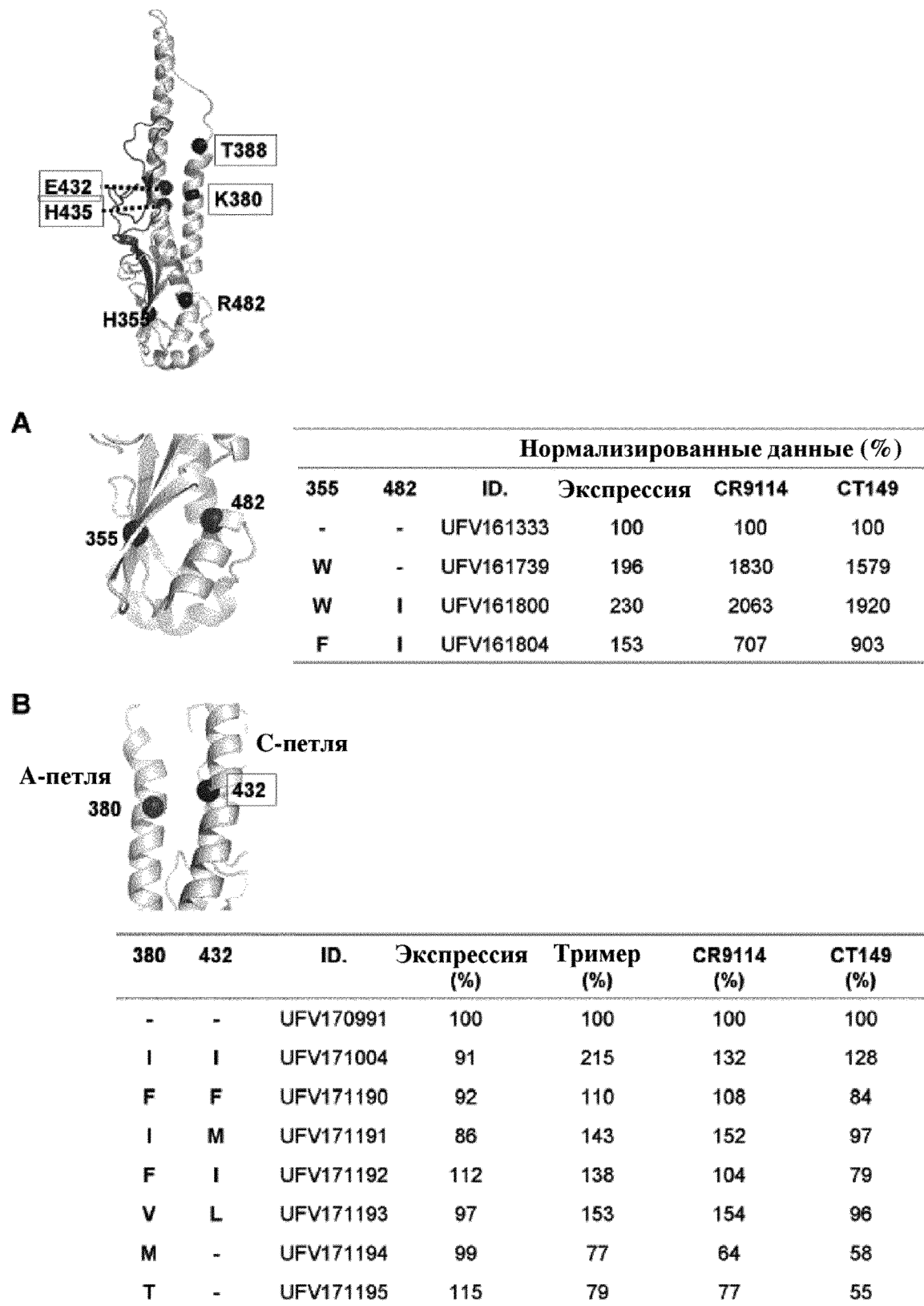
ФИГ. 3



ФИГ. 3 (Продолжение)



ФИГ. 4



ФИГ. 5

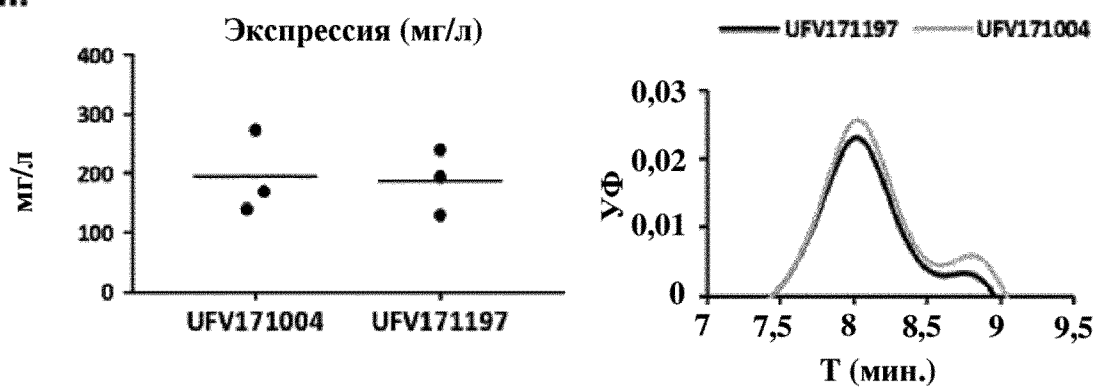
С



I.

435	ID.	Экспрессия (%)	Тример (%)	CR9114 (%)	CT149 (%)
-	UFV170611	100	100	100	100
K	UFV170612	123	71	99	96
N	UFV170613	102	103	107	106
Q	UFV170614	116	81	94	87
R	UFV161908	87	78	113	108

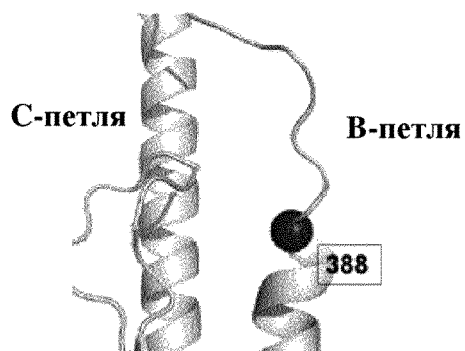
II.



Положение 435	ID.	CR9114 (EC ₅₀)	CT149 (EC ₅₀)	Температурная стабильность (Tm ₅₀)
N	UFV171004	0,075 нМ	0,075 нМ	68,0°C
R	UFV171197	0,084 нМ	0,075 нМ	64,1°C

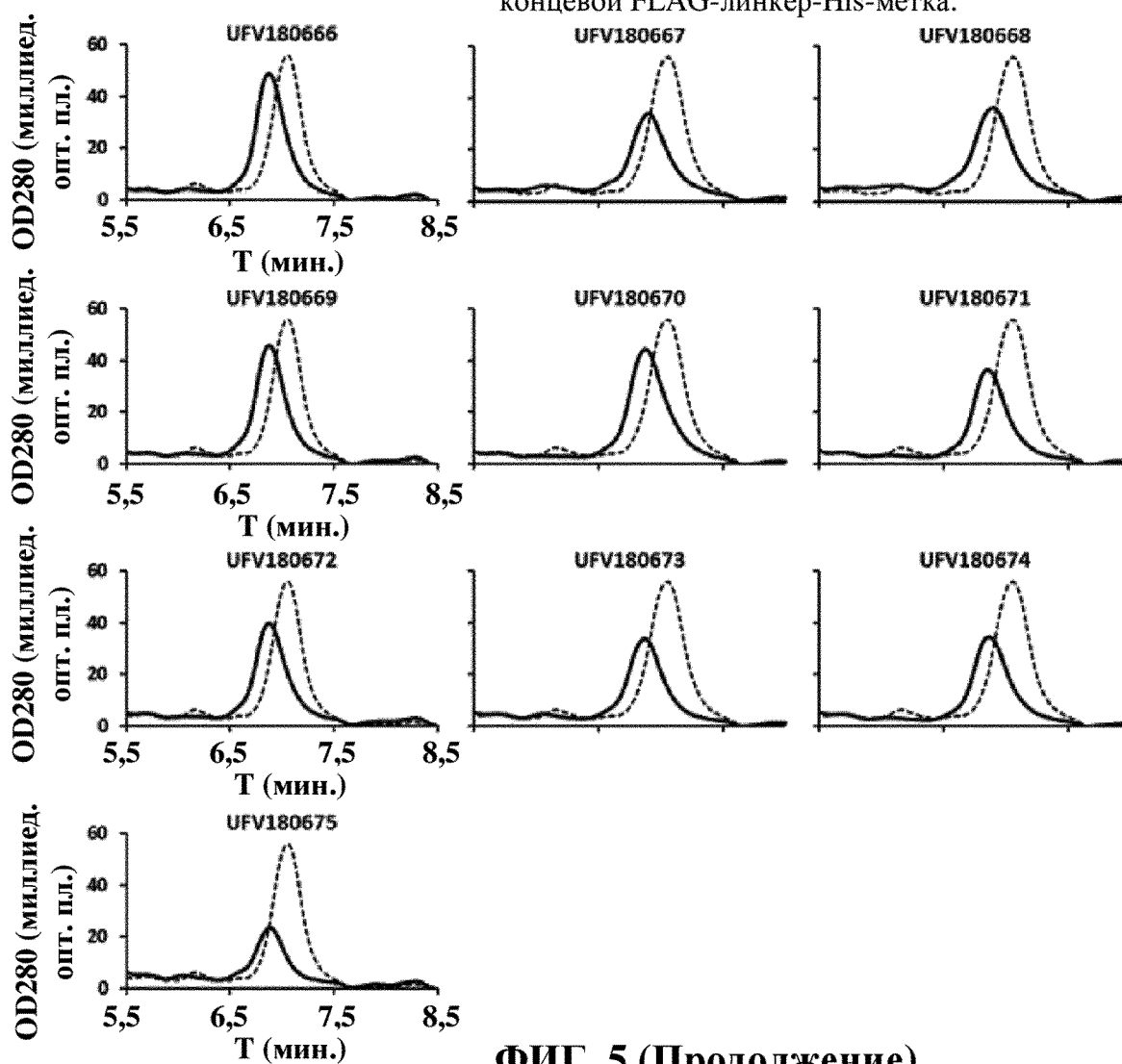
ФИГ. 5 (Продолжение)

D

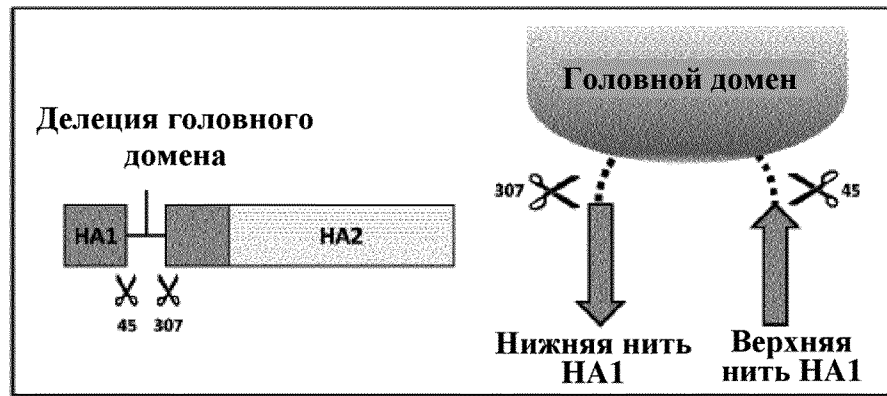


ID.*	Положение 388	Экспрессия (мг/л)
UFV180088 (R)	M	475
UFV180666 (WT)	T	446
UFV180667	V	332
UFV180668	I	336
UFV180669	L	427
UFV180670	F	400
UFV180671	Y	284
UFV180672	W	287
UFV180673	H	294
UFV180674	K	245
UFV180675	R	192

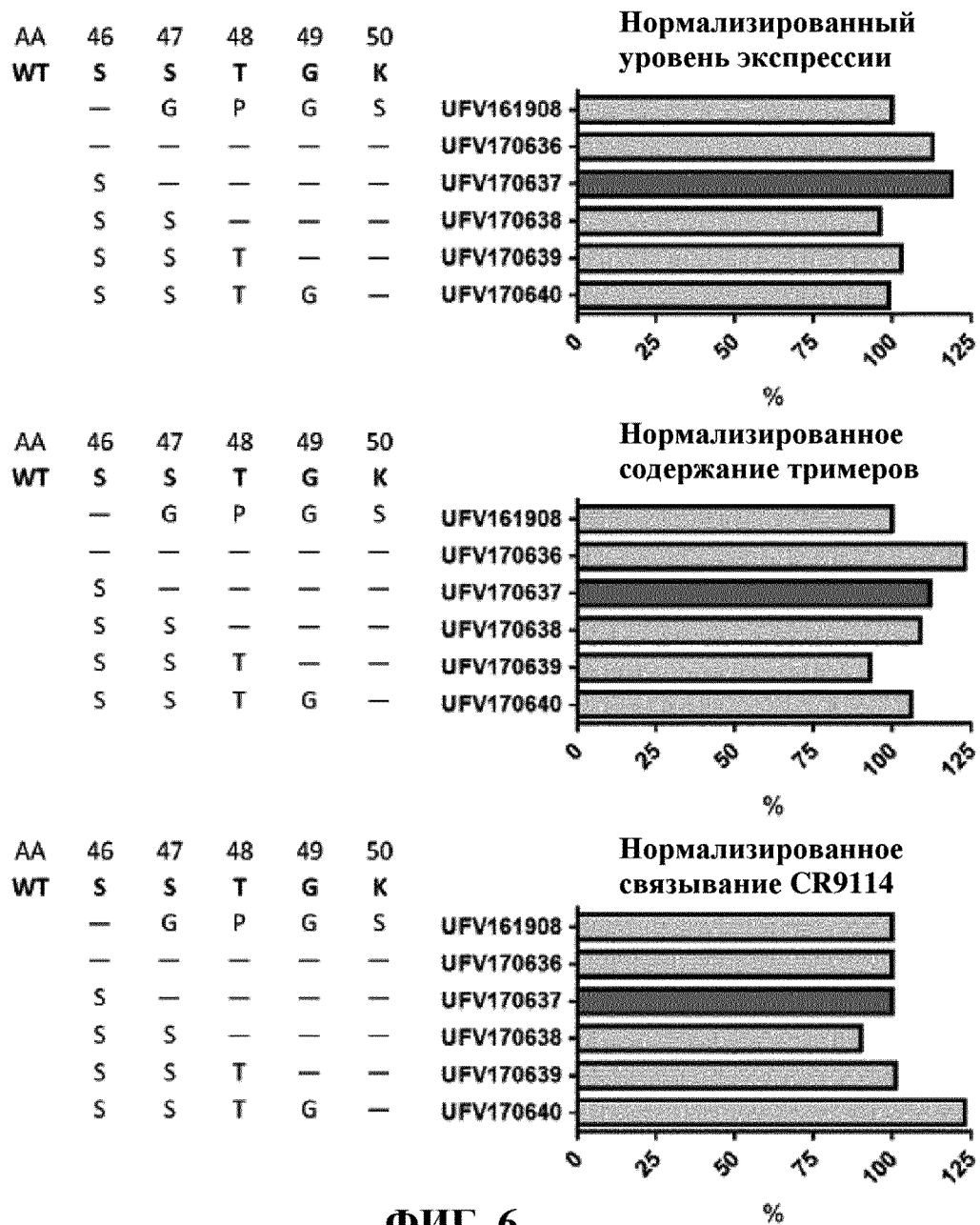
*Эталон (R) содержит С-концевую С-метку.
От UFV180666 до UFV 180675 содержит С-концевой FLAG-линкер-His-метка.



ФИГ. 5 (Продолжение)



A



ФИГ. 6

В

ID.	Соединение	Экспрессия (%)	Связывание СТ149 (%)
UFV160653*	GPGS	100	100
UFV160764		83	64
UFV160765		61	50
UFV160766		47	25
UFV160674		79	60
UFV160675		62	37
UFV160767		87	87
UFV160768		70	63
UFV160769		72	33
UFV160770		50	20
UFV160771		78	63
UFV160772		84	69

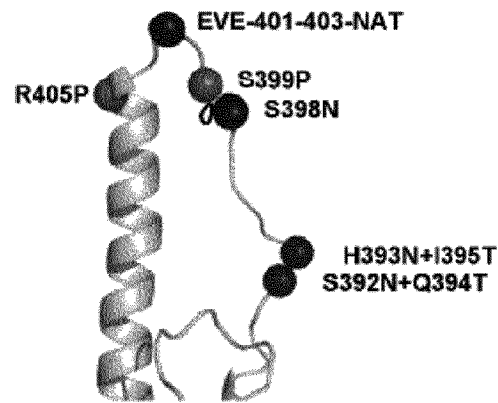
*Эталон, **Точечная мутация по типу замены цистеина на глицин

С

ID.	Соединение	Экспрессия (%)	Связывание СТ149 (%)
UFV160321*	GGGG	100	100
UFV160403	NPHR	118	198
UFV160404	GDPH	117	70
UFV160405	NGGS	33	63
UFV160406	GGSN	223	313
UFV160407	GSNA	113	204
UFV160408	GPGS	190	350
UFV160409	GSGF	127	154
UFV160410	GSG	100	165
UFV160411	GG	118	248
UFV160412	GGG	106	181
UFV160413	SGS	110	161
UFV160414	HPST	101	118
UFV160415	IPNI	124	129
UFV160416	GLSS	164	284
UFV160417	KPGD	170	160
UFV160418	DAPI	174	57
UFV160419	TPN	86	124
UFV160420	TPNG	125	258

*Эталон

ФИГ. 6 (Продолжение)

**A**

введение гликана			ID.	Нормализованные данные (%)			
401	402	403		Экспрессия	CR9114	CT149	SD15013
E	V	E	UFV161686	100	100	100	100
N	A	T	UFV161333	205	503	679	992
Q	A	T	UFV161722	150	330	384	548
N	A	Q	UFV161723	136	388	338	432

B

ID.	Положение пролина	Экспрессия (%)	CR9114 (%)	CT149 (%)	SD15013 (%)
UFV161333	—	100	100	100	100
UFV161688	386	114	12	1	5
UFV161689	387	111	4	2	3
UFV161690	388	113	3	1	1
UFV161691	389	106	28	16	3
UFV161692	390	105	154	64	64
UFV161693	391	106	129	74	58
UFV161694	392	114	162	89	104
UFV161695	393	128	150	84	82
UFV161696	394	104	177	95	75
UFV161697	395	100	156	99	113
UFV161698	396	98	174	97	153
UFV161699	397	101	119	92	58
UFV161700	398	110	160	96	134
UFV161701	399	104	158	110	158
UFV161702	400	94	117	76	62
UFV161703	401	99	103	61	58
UFV161704	402	97	101	64	45
UFV161705	403	98	109	68	50
UFV161706	404	104	129	76	54
UFV161707	405	113	147	90	55
UFV161708	392+396	106	166	93	147
UFV161709	392+398	107	140	86	115

ФИГ. 7

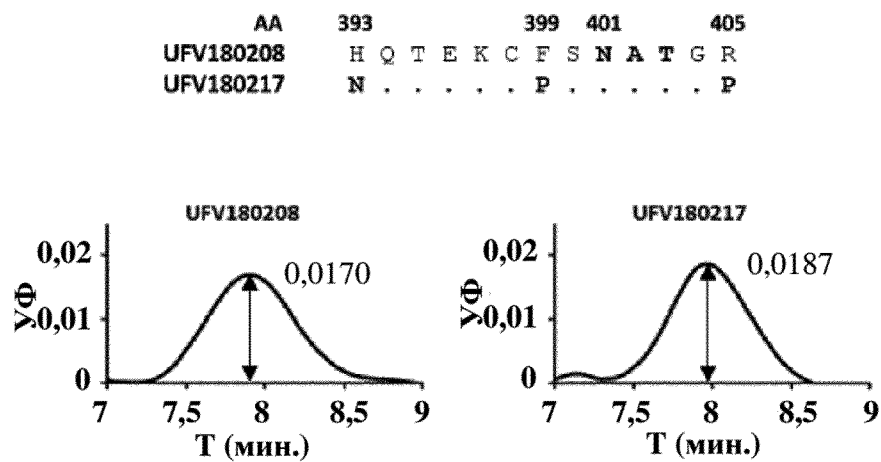
C

2-е введение гликана			ID.	Нормализованные данные (%)			
393	394	395		Экспрессия	CR9114	CT149	SD15013
H	Q	T	UFV161333	100	100	100	100
N	Q	T	UFV161715	117	141	81	42
398	399	400					
E	S	S	UFV161333	100	100	100	100
N	S	S	UFV161721	109	147	97	83

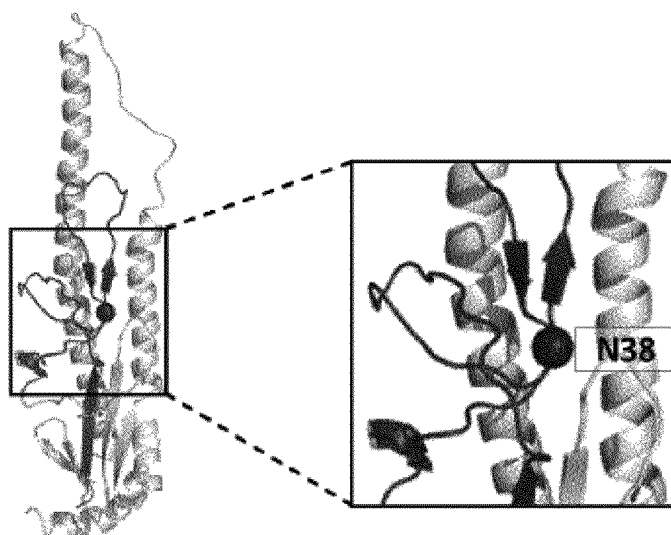
D

ID.	Положение(-я) гликана	Остаток(-и) пролина	Экспрессия (мг/л)	CR9114 (%)	CT149 (%)	SD15013 (%)
UFV171187	401	—	216	100	100	100
UFV170991	401	405	81	71	72	63
UFV171120	392+401	405	98	78	83	48
UFV171121	392+401	399+405	109	101	91	85
UFV170994	393+401	405	100	103	90	78
UFV170995	393+401	399+405	130	107	97	88

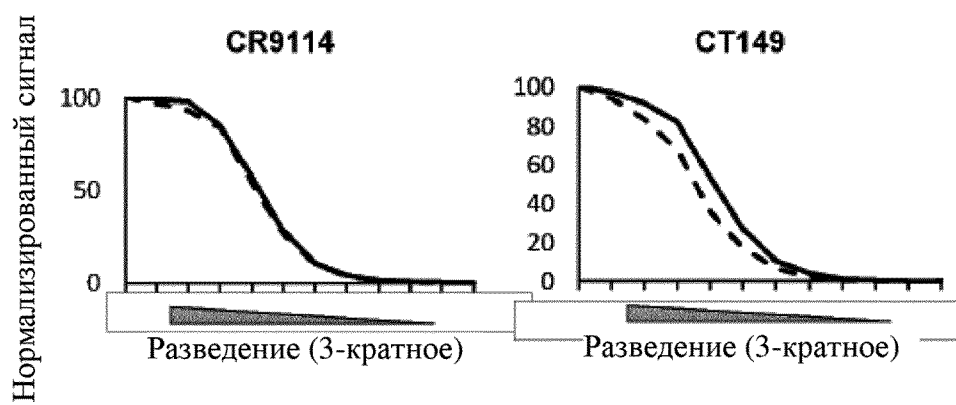
E

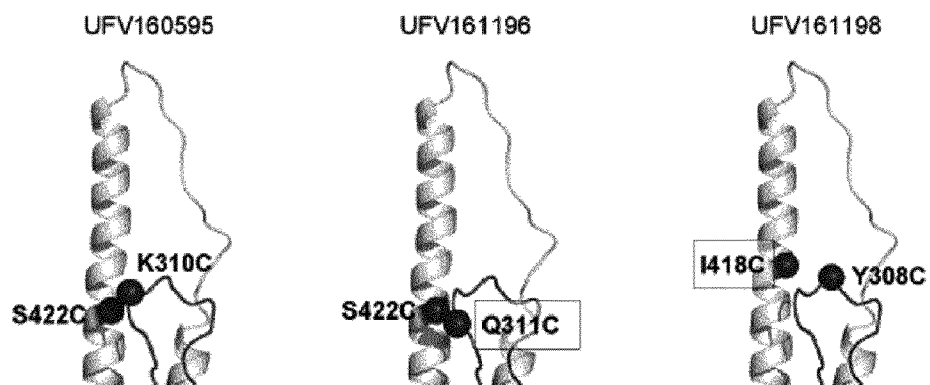


ФИГ. 7 (Продолжение)

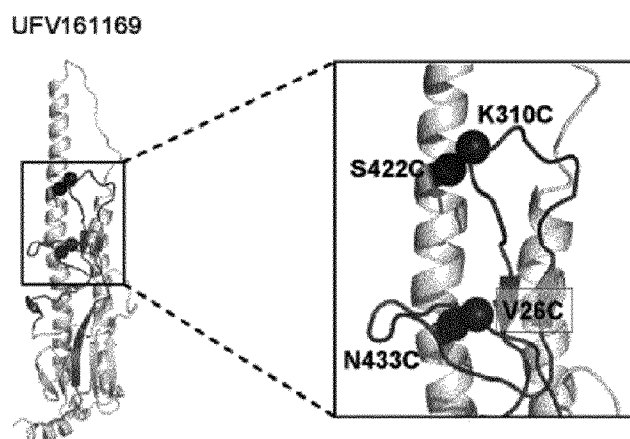
**A**

38	39	40	ID.	Экспрессия	CR9114 (EC ₅₀)	CT149 (EC ₅₀)
N	A	T	UFV170282	484 мг/л	1,4 нМ	0,7 нМ
N	A	I	UFV170278	255 мг/л	0,7 нМ	0,7 нМ

B**ФИГ. 8**

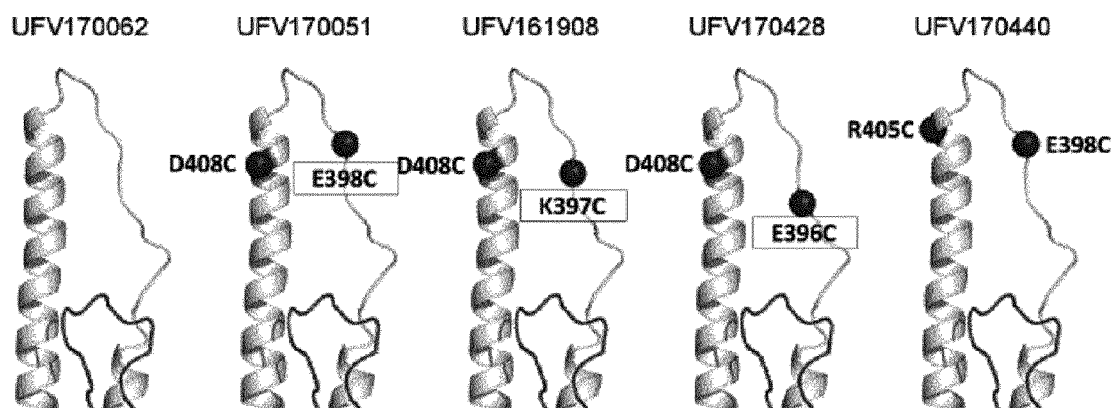
A

308	309	310	311	418	419	420	421	422	ID.	Экспрессия (%)	CR9114 (%)	CT149 (%)
-	-	C	-	-	-	-	-	C	UFV160595	100	100	100
-	-	-	C	-	-	-	-	C	UFV161196	86	118	134
C	-	-	-	C	-	-	-	-	UFV161198	80	69	110

B

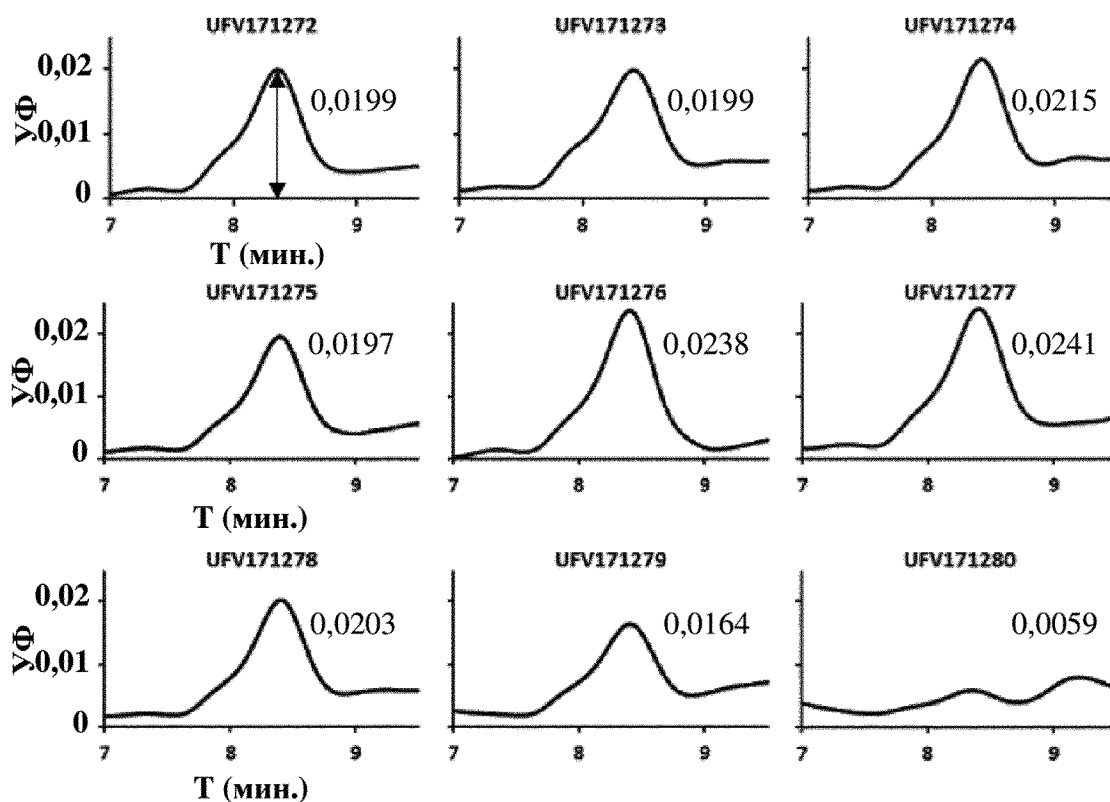
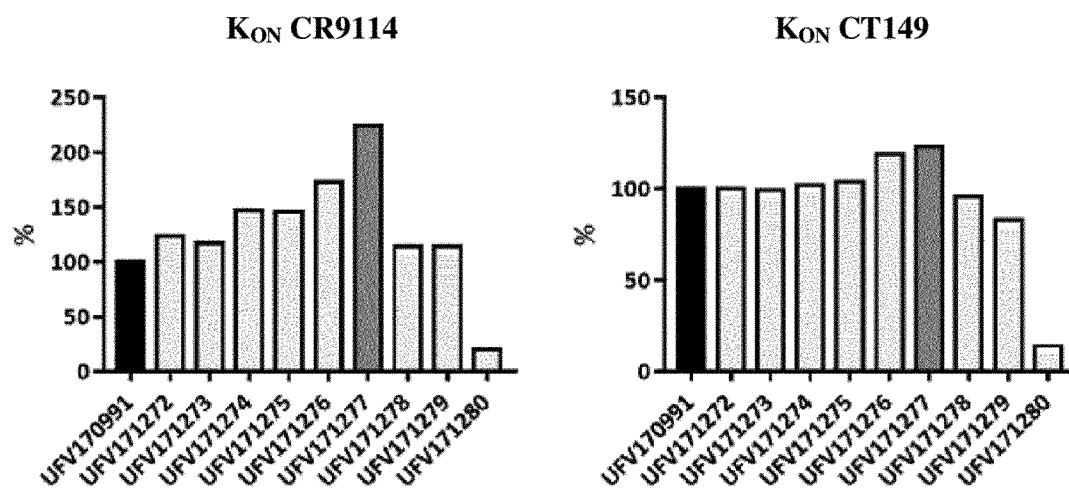
24	25	26	27	431	431	433	434	ID.	Экспрессия (%)	CR9114 (%)	CT149 (%)
-	-	-	-	-	-	-	-	UFV160595	100	100	100
-	-	C	-	-	-	C	-	UFV161169	90	2	48

ФИГ. 9



396	397	398	405	406	407	408	ID.	Экспрессия (%)	Тример (%)	CR9114 (%)	CT149 (%)
-	-	-	-	-	-	-	UFV170062	180	4	48	33
-	-	C	-	-	-	C	UFV170051	100	100	100	100
-	C	-	-	-	-	C	UFV161908	112	100	115	93
C	-	-	-	-	-	C	UFV170428	108	78	94	95
-	-	C	C	-	-	-	UFV170440	121	92	92	74

ФИГ. 10

A**B**

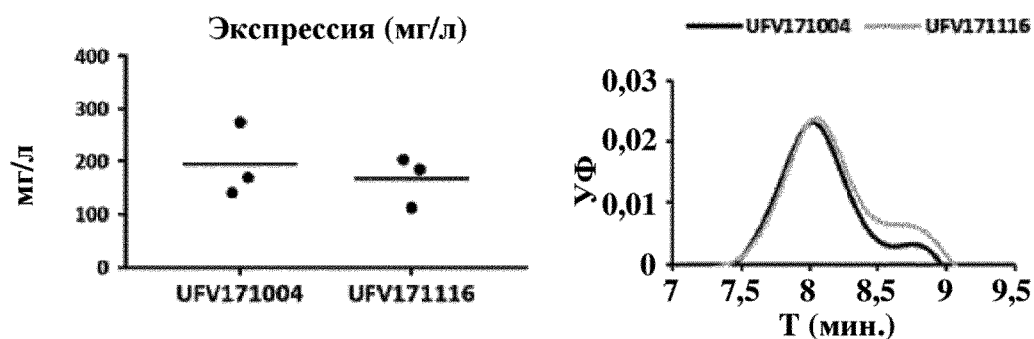
ФИГ. 11

A

378	379	381	ID.	Экспрессия (%)	CR9114 (%)	CT149 (%)
N	G	L	WT H3			
-	-	-	UFV161454	100	100	100
-	N	-	UFV161453	130	61	24
-	A	-	UFV161459	42	155	65
-	N	V	UFV161451	163	947	561
-	A	V	UFV161458	75	1072	589
T	N	-	UFV161450	96	235	353
T	N	V	UFV161448	84	1706	841
T	N	V	WT H1			

B

		AA	378	379	381
UFV171004	H1 A-helix	D Q I	T N I	V N R	
UFV171116	H3 A-helix	.	N G	L .	.

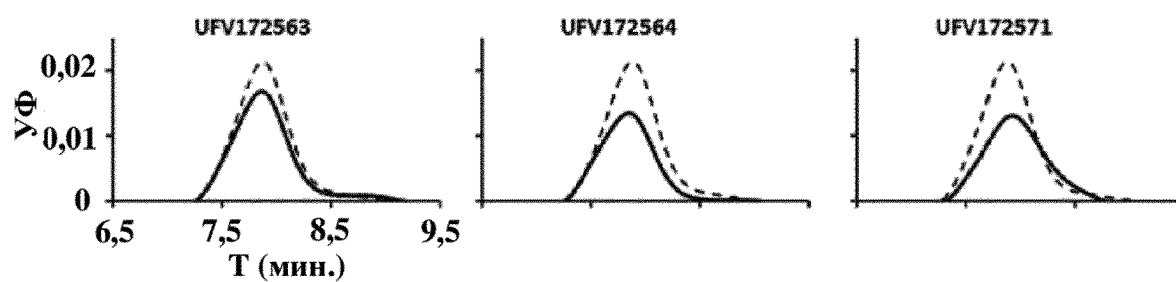


ID.	Тример % AUC	CR9114 (EC ₅₀)	CT149 (EC ₅₀)	Температурная стабильность (Tm ₅₀)
UFV171004	87,3	0,075 нМ	0,075 нМ	68,0°C
UFV171116	77,7	0,081 нМ	0,078 нМ	66,2°C

ФИГ. 12

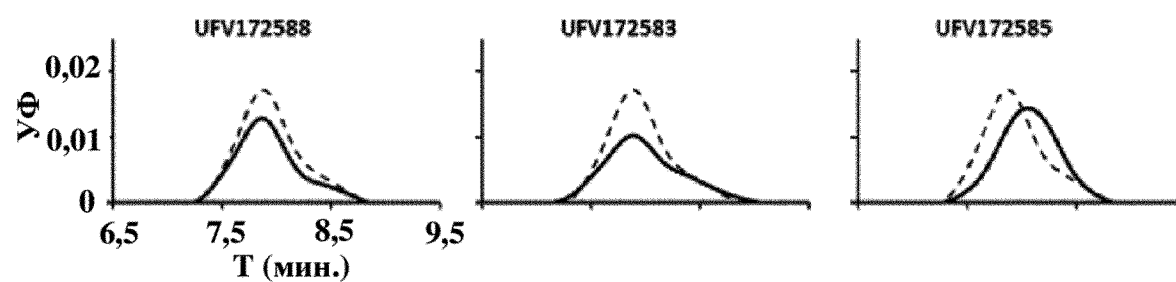
A

25	27	367	379	381	475	476	479	ID.	Тример %	CR9114 (%)	CT149 (%)
L	K	L	N	V	N	A	E	UFV172561	100	100	100
-	-	Y	-	-	D	D	A	UFV172563	78	118	118
K	-	Y	-	-	D	D	A	UFV172564	63	115	105
K	N	Y	-	-	-	D	A	UFV172571	62	77	81

**B**

25	27	367	379	381	475	476	479	ID.	Тример %	CR9114 (%)	CT149 (%)
L	K	L	G	L	N	A	E	UFV172562	100	100	100
K	-	Y	-	-	-	D	A	UFV172588	75	98	95
K	-	Y	-	-	D	D	A	UFV172583	60	90	82
K	N	Y	-	-	D	D	A	UFV172585	83*	53	55

*Сдвинутый тримерный пик (см. паттерн SEC)

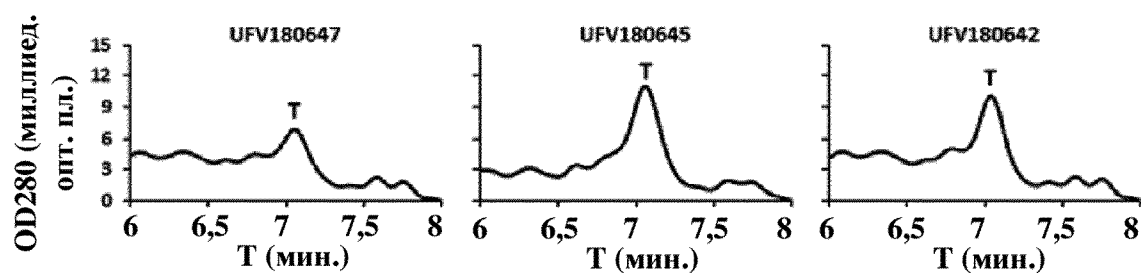


ФИГ. 13

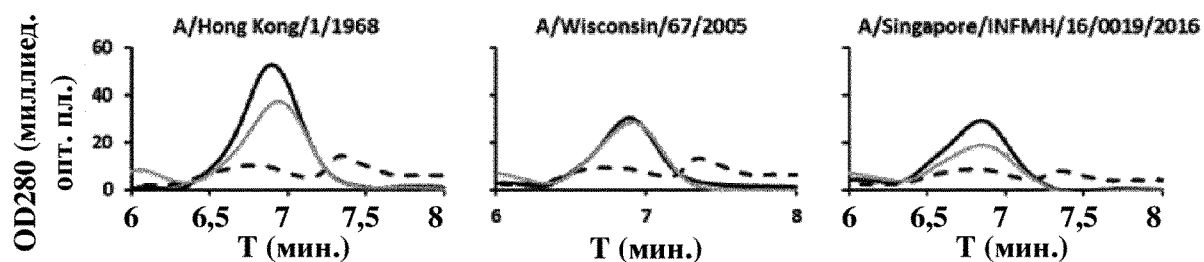
Структура	Структурные элементы	Мутации
I	Введение GCN4	405-RMKCIEDKIEEIESK-419
	Внутримолекулярный дисульфидный мостик	K310C + S422C
	Внутрипротомерный дисульфидный мостик	E398C + D408C
	Оптимизация бета-листа	H355W
	Мутации А-спирали	N378T, G379N, L381V
	Введение гликана в В-петлю	EVE-401-403 to NAT
II	I+стабилизирующие В-петлю мутации	F392S, I395T, F399S
III	I+стабилизирующие В-петлю мутации	F392S, H393N, I395T, F399P, R405P

Штаммы H3	ID.		
	I	II	III
A/Hong Kong/1/1968	UFV180647	UFV181117	UFV181106
A/Wisconsin/67/2005	UFV180645	UFV181118	UFV181107
A/Singapore/INFIMH/16/0019/2016	UFV180642	UFV181120	UFV181109

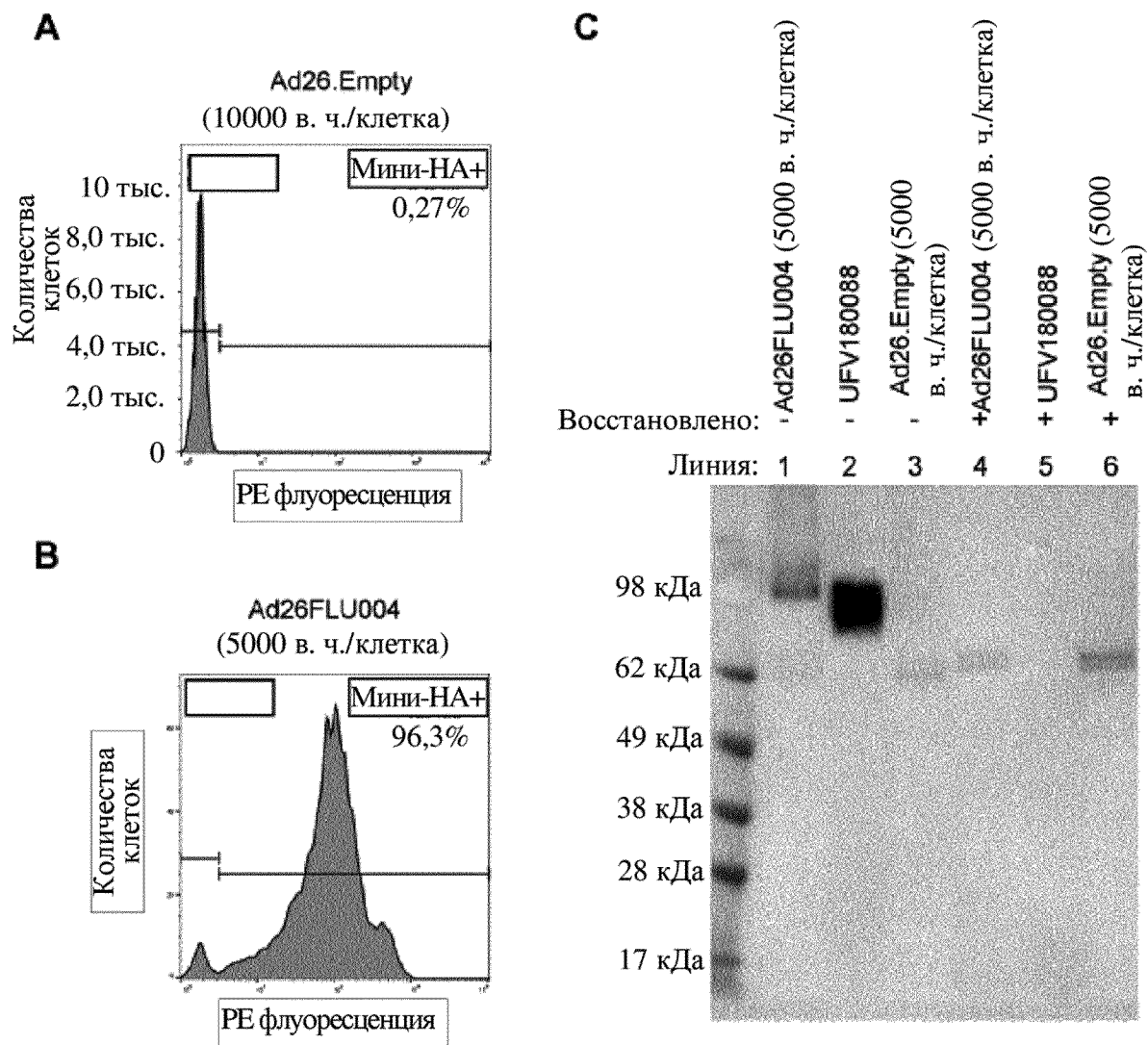
A



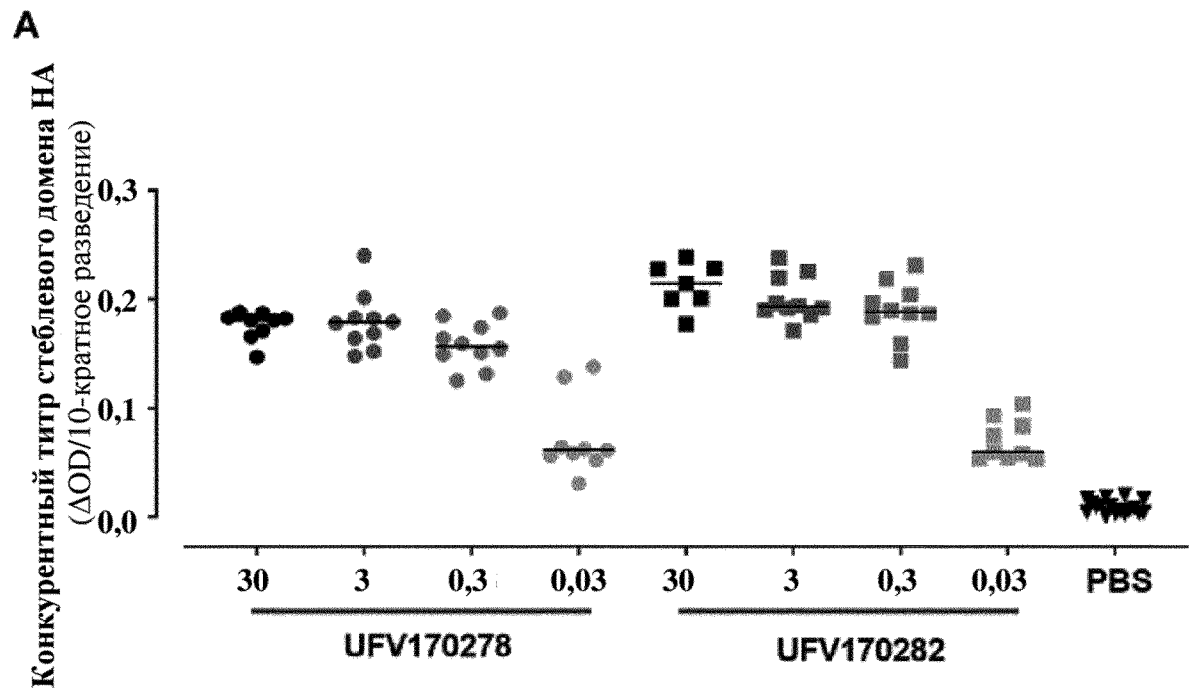
B



ФИГ. 14

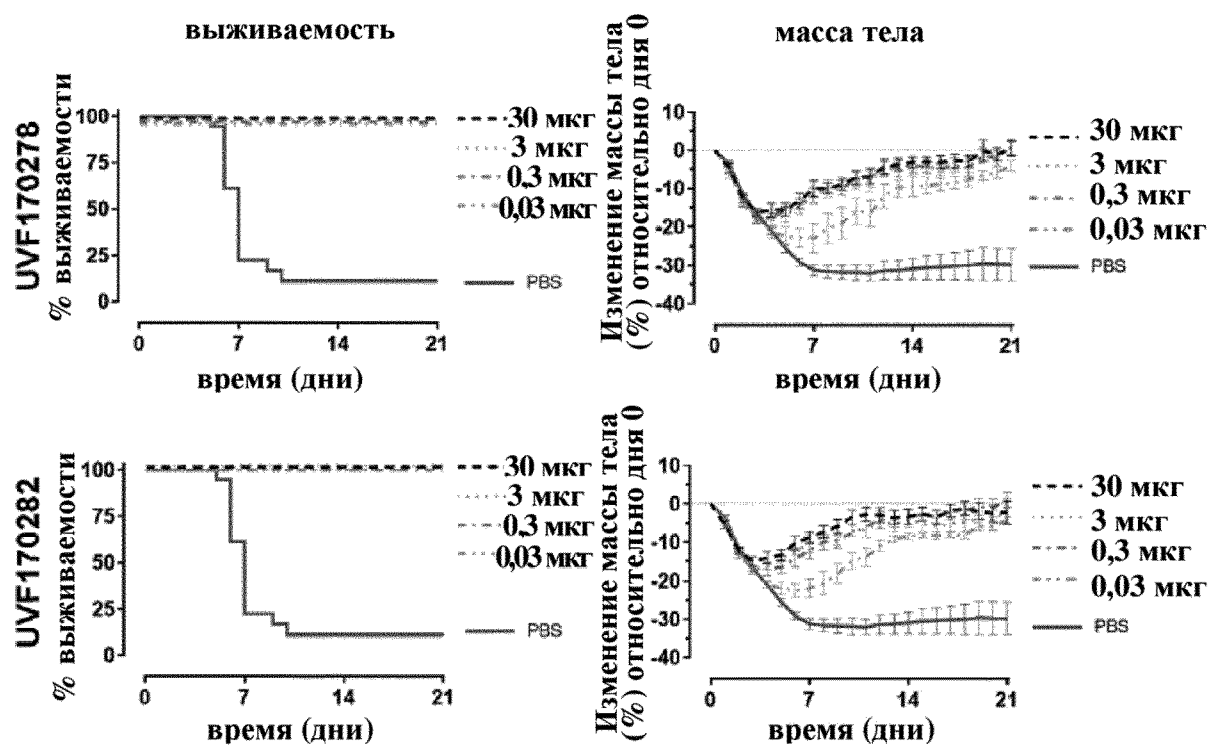


ФИГ. 16

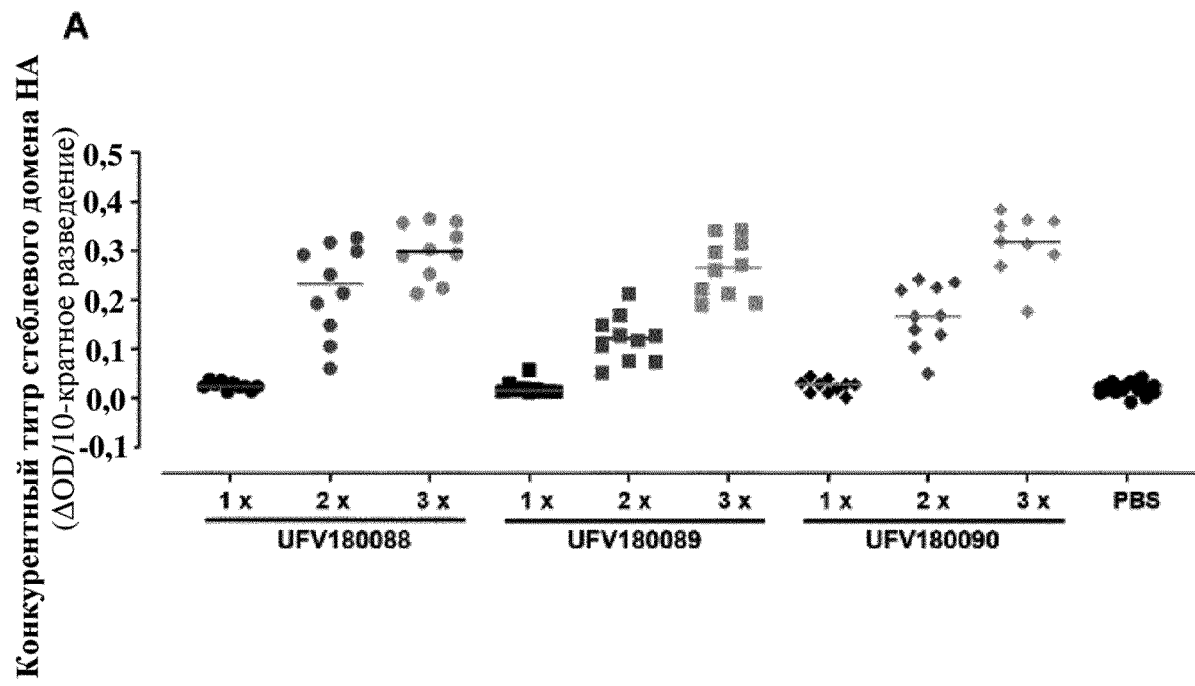


ФИГ. 17

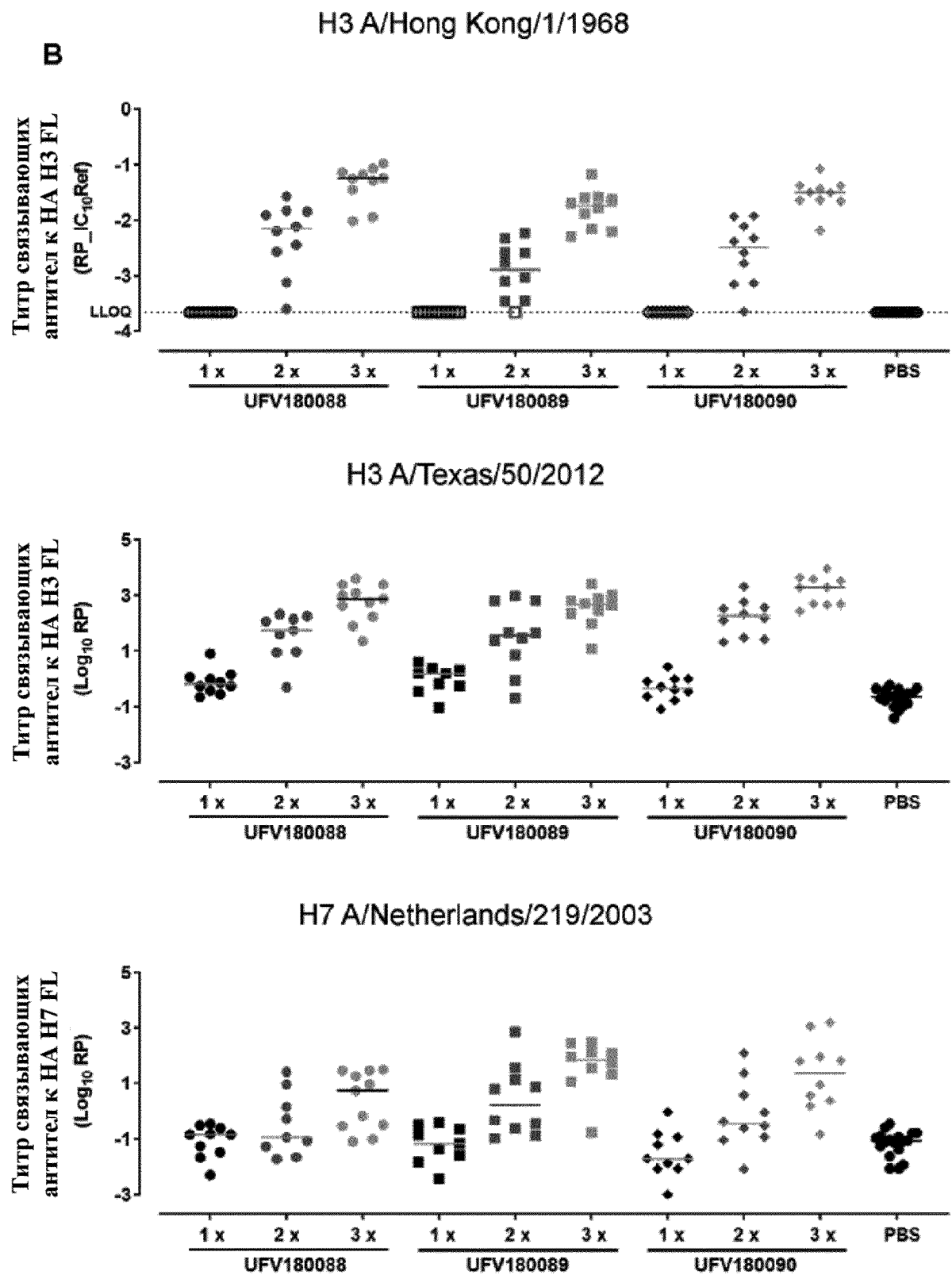
В



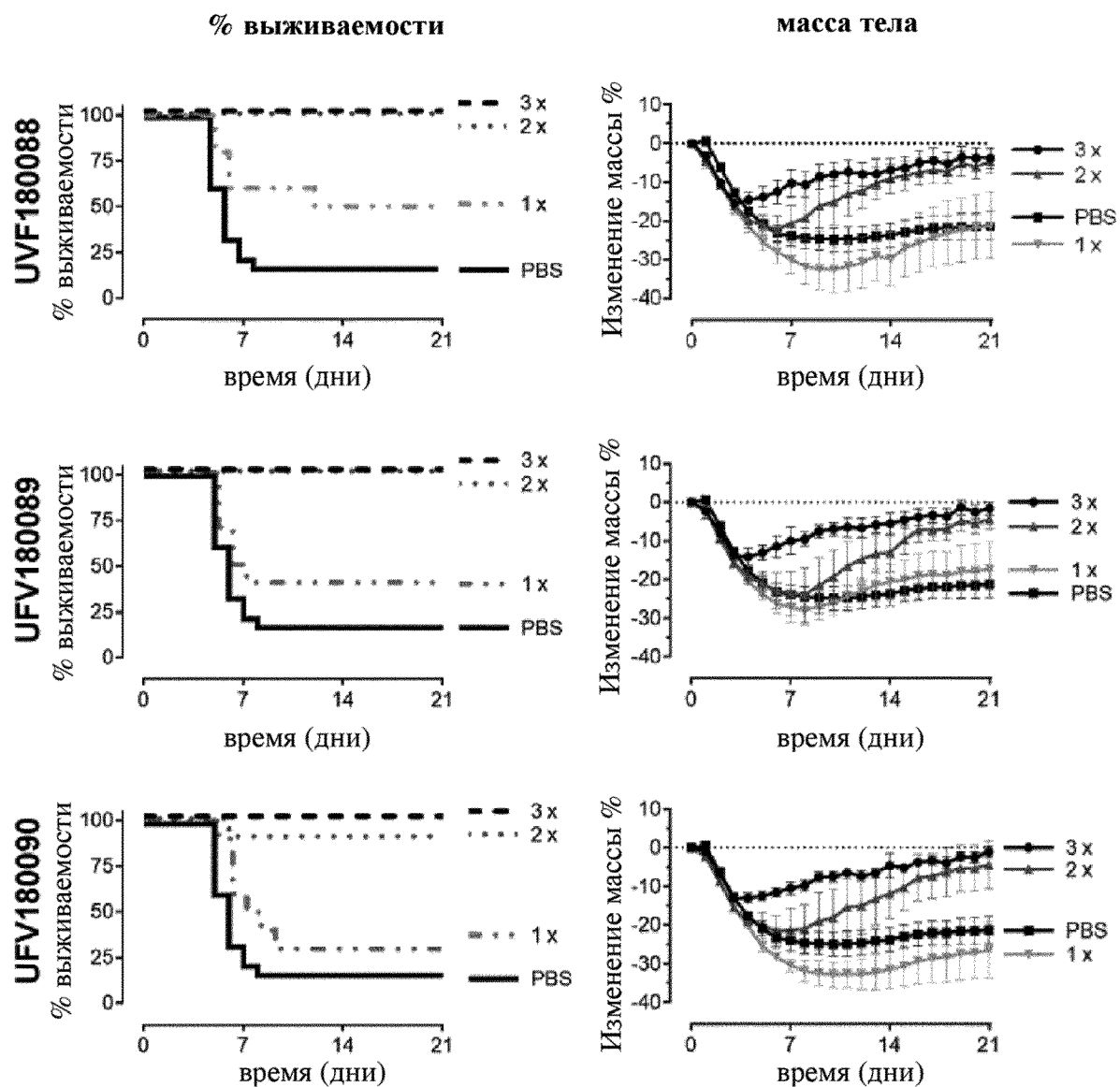
ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 18



ФИГ. 19